



CATARINA ISABEL AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO CÁDMIO EM
CURRALO DE PAIVA DUAS ESPÉCIES DE *THLASPI*



**CATARINA ISABEL AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO CÁDMIO EM
CURRALO DE PAIVA DUAS ESPÉCIES DE *THLASPI***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica da Dra. Conceição Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e CESAM.

Ao meu “Núcleo Duro” de estabilidade emocional

“A Terra não a herdámos dos nossos pais, pedimo-la emprestada aos nossos
filhos”

(Provérbio antigo do Quênia)

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria de Lourdes Pereira

professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Maria da Conceição Lopes Vieira Santos

professora associada com agregação da Universidade de Aveiro e CESAM

Prof. Dr. Ulisses Manuel de Miranda Azeiteiro

professor auxiliar com agregação da Universidade Aberta

Dra. Albertina Pires Lopes.

pós doutoranda da Universidade de Aveiro/CESAM

agradecimentos

Para que a realização deste projecto fosse possível foi essencial a flexibilidade e tolerância da Dr.^a Rosa Cerveira e do Dr. João Pires;

A prontidão da Professora Doutora Conceição Santos;

A disponibilidade da Tina e da Marta, sempre presentes ao longo de todo o trabalho;

A colaboração dos colegas de laboratório, nomeadamente da Cristina e da Tânia;

A ajuda, sempre que necessário, do Armando;

A amizade e companheirismo dos colegas de mestrado.

Agradeço ainda

Ao Professor Luís Souto;

À Helena Moreira;

À Sílvia;

À Liliana;

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha cunhada sempre presentes e compreensivos.

Ao meu sobrinho e aos meus priminhos cujo sorriso e boa disposição são uma boa dose de energia e alento para mais uma etapa.

A todos os que de alguma forma com um pequeno gesto ou palavra colaboraram para que a realização deste projecto fosse possível.

palavras-chave

Thlaspi arvense, *Thlaspi caerulescens*, microssatélites, instabilidade genética

resumo

O cádmio é um contaminante extremamente tóxico para o ambiente e para a população em geral. Apresenta efeitos citotóxicos, carcinogénicos e mutagénicos. A mutagénese reflecte instabilidade genética e pode ser avaliada através de técnicas moleculares (e.g. microssatélites).

Neste trabalho os efeitos mutagénicos/genotóxicos do cádmio vão ser avaliados em duas espécies de *Thlaspi*, uma não acumuladora de cádmio (*Thlaspi arvense*) e outra hiperacumuladora (*Thlaspi caerulescens*). As sementes foram colocadas em papel de filtro com 0 e 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ de modo a germinarem. Ao sexto dia as plântulas foram transferidas para o meio de Rorison, onde cresceram durante 22 dias em presença das concentrações de cádmio acima referidas.

No fim da exposição colheram-se as plantas, mediu-se raiz e parte aérea e fez-se a avaliação da acumulação de cádmio. As plantas da espécie *T. arvense* expostas a cádmio apresentaram clorose generalizada e necrose nas folhas expandidas, crescimento diminuído e acumulação de cádmio essencialmente na raiz. No caso das plantas de *T. caerulescens* expostas a cádmio não se observaram diferenças na morfologia da folha nem no crescimento e a acumulação de cádmio ocorreu preferencialmente nas folhas. Fez-se a extracção do DNA genómico da raiz das duas espécies de modo a avaliar a instabilidade de microssatélites. Nas condições do estudo e nos microssatélites analisados não foi detectada instabilidade genética. Contudo o estudo deve ser complementado recorrendo a outros marcadores moleculares.

keywords

Thlaspi arvense, *Thlaspi caerulescens*, microsatellites, genetic instability

abstract

Cadmium (Cd) is a non essential element and is a widespread environmental pollutant. Exposure to Cd can result in cytotoxic, carcinogenic and mutagenic effects. Mutagenesis can be assayed with the use of molecular techniques such as microsatellites and, measuring genetic instability, may be a powerful complement in toxicological evaluations. In this study the mutagenic/genotoxic effects of cadmium will be evaluated in two species of the genus *Thlaspi*, the Cd hyperaccumulator alpine pennycress (*T. caerulescens*) and the non-accumulator field pennycress (*T. arvense*). Plant seeds were placed in filter paper imbibed in distilled water with 0 and 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ for germination. Six day old plantlets were then grown on Rorison solution supplemented with the same concentrations of cadmium for 22 days. At the end of the exposure, plants were harvested, and root and shoot lengths, as well as Cd accumulation, were estimated. Cd-exposed plants of *T. arvense* showed chlorotic expanded leaves, lower growth and Cd accumulated mostly in roots. Cd-exposed *T. caerulescens* presented no significant differences in leaf morphology or growth, and Cd accumulated preferentially in leaves. Genomic DNA was extracted from roots of both species and microsatellites (SSRs) were then amplified in order to evaluate genetic instability, but no genetic instability was observed. Data suggest that for these species and for the Cd exposure conditions tested, Cd does not induce microsatellite instability. However, the use of other molecular markers is required in order to complement this study.

ÍNDICE GERAL

Júri

Agradecimentos

Resumo

Índice Geral

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Simbologia

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	1
INTRODUÇÃO	3
Cádmio	3
Interacção plantas – metal	5
Genotoxicidade	7
Técnicas mais usadas para a detecção de genotoxicidade	8
<i>Polimorfismo da Dimensão dos Fragmentos de Restrição ou RFLPs</i>	<i>9</i>
<i>Reacção em Cadeia da Polimerase ou PCR</i>	<i>10</i>
<i>Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso ou RAPDs</i>	<i>11</i>
<i>Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados ou AFLPs</i>	<i>11</i>
<i>Microsatélites</i>	<i>11</i>
<i>Outras técnicas para avaliação de alterações no DNA</i>	<i>12</i>
O género <i>Thlaspi</i> como modelo na avaliação de toxicidade de metais e estudos de fitorremediação	13
Objectivo	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

**CAPÍTULO II - EFEITOS FISIOLÓGICOS E GENOTÓXICOS DO CÁDMIO EM *THLASPI*
ARVENSE E *THLASPI CAERULESCENS***

25

PHYSIOLOGICAL AND GENOTOXIC EFFECTS OF CADMIUM IN HYPERACCUMULATOR AND NON-ACCUMULATOR <i>THLASPI</i> SPECIES	27
Abstract	27
<i>Keywords</i>	27
Introduction	29
Materials and Methods	33
<i>Plant material and growth conditions</i>	33
<i>Cadmium analysis</i>	34
<i>DNA extraction</i>	34
<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	34
<i>Fragments analysis</i>	36
<i>Statistical analysis</i>	37
Results	38
<i>Plants growth</i>	38
<i>Cadmium accumulation</i>	40
<i>Microsatellite instability</i>	41
Discussion	45
References	50

CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS/PERSPECTIVAS FUTURAS

55

CONSIDERAÇÕES FINAIS/PERSPECTIVAS FUTURAS

57

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1.1	Potenciais fontes de cádmio para as plantas	4
Fig 1.2	Mecanismos propostos para a indução de mutagenese pelo cádmio	7
Fig 1.3	Amplificação do DNA através da reacção em cadeia da polimerase (PCR)	10
Fig 1.4	<i>Thlaspi caerulescens</i>	14
Fig 1.5	<i>Thlaspi arvense</i>	16
<hr/>		
Fig 2.1	Control plants and Cd-exposed plants of <i>Thlaspi arvense</i> and <i>Thlaspi caerulescens</i> during the culture	33
Fig 2.2	<i>T. arvense</i> and <i>T. caerulescens</i> control and Cd-exposed plants, at the end of the exposure	38
Fig 2.3	Assessment of <i>T. arvense</i> and <i>T. caerulescens</i> root and shoot lenght after 6 and 28 days of hydroponic culture in the presence and absence of cadmium	39
Fig 2.4	Agarose gel electrophoresis with EB staining showing genomic DNA	41
Fig 2.5	Agarose gel electrophoresis with EB staining showing SSR's	41
Fig 2.6	Electropherograms correspondent to <i>Thlaspi arvense</i> : SSR (19,20)	43
Fig 2.7	Electropherograms correspondent to <i>Thlaspi caerulescens</i> : SSR (19,20)	44

ÍNDICE DE TABELAS

Table 2.1	General features of the 15 genomic DNA regions characterised for sequence polymorphism by Basic and Besnard (2006) and its identification as CAPS or SSR. Identification of microsatellites analysed in the present work. Location of ssr (used) polymorphism and number (N) (adapted from Basic and Besnard (2006))	35
Table 2.2	Characteristics of microsatellite loci	36
Table 2.3	Accumulation of cadmium in roots and leaves of <i>T. arvense</i> and <i>T. caerulescens</i> at the end of the exposure (day 28)	40
Table 2.4	SSR locus used in this work and the correspondent allele size obtained for control and Cd-exposed plants of <i>T. arvense</i> and <i>T. caerulescens</i>	42
Table 2.5	SSR locus used in this work and the correspondent allele size obtained and the allele size obtained in other study and described by Basic and Besnard (2006)	42

SIMBOLOGIA

AFLPs	“Amplified Fragment Length Polymorphism” Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ATP	Adenina trifosfato
bp	Pares de bases
CAPS	“Cleaved Amplified Polymorphic Sequences”
Cd	Cádmio
CTP	Citosina trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	“Ethylene-diamine-tetraacetic-acid” Ácido etilenodiamino tetra-acético
EB	Brometo de etídio
GTP	Guanina trifosfato
ICPS	“Inductively Coupled Plasma Spectroscopy”
OSHA	“Occupational Safety and Health Administration”
MN	Micronúcleos
MSI	Microsatellite instability
MTs	Metalotioninas
PCs	Fitoquelatinas
PCR	“Polymerase Chain Reaction” Reacção em cadeia da polimerase
RAPDs	“Random Amplified Polymorphic DNA” Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RFLPs	“Restriction Fragment Length Polymorphism” Polimorfismo da dimensão dos fragmentos de restrição
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SSRs	"Simple Sequence Repeats" Microsatélites (sequências simples repetidas)
<i>Taq</i> DNA polimerase	DNA polimerase termostável isolada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T.a.	<i>Thlaspi arvense</i>
T.c.	<i>Thlaspi caerulescens</i>
TTP	Tiamina trifosfato

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

O lançamento recente do filme de um dirigente político (Al Gore) de uma das maiores potências do mundo, EUA - “Uma verdade inconveniente” –, a “Operação Live Earth” que decorreu no passado Verão (2007) e o lançamento do livro “O Mundo Sem Nós”, de Alan Weisman, são acções essenciais para a sensibilização da população em geral e para a consciencialização da problemática do desenvolvimento sustentável.

O impacto da actividade humana no meio ambiente é uma preocupação crescente. Essencialmente após a revolução industrial, ocorreu a sobre-utilização de recursos naturais não renováveis, o que conduziu à discussão, nas últimas décadas, da problemática da exaustão dos recursos do planeta e do desenvolvimento sustentável (e.g. esgotamento de reservas e aquecimento global). Como exemplo desta preocupação global, cite-se o Protocolo de Quioto (referente ao controlo de emissão de gases e controlo do efeito de estufa), assinado em 1997, e recentemente ratificado por 175 países. Outro exemplo é a importância dada à educação ambiental/desenvolvimento sustentável nas escolas.

Dentro dos problemas ambientais, a acumulação de metais pesados em solos e cursos de água, quer por origem natural (vulcanismo, erosão) (Grispen *et al.*, 2006), quer por causas antropogénicas (e.g. locais de extracção de minérios, zonas com resíduos industriais), tem também sido alvo de intensos estudos (e.g. Pereira *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007) e pode atingir em alguns locais de Portugal níveis preocupantes (Pereira *et al.*, 2004).

Cádmio

Os metais pesados são contaminantes largamente difundidos no ambiente. Dentro destes, o cádmio (Cd) é considerado por várias Organizações extremamente tóxico para o ambiente e para a população em geral (e.g. USA Occupational Safety and Health Administration, 2005).

O Cd apresenta peso molecular 112.41 e número atómico 48 (Roman *et al.*, 2002). Emite vapores mesmo em estado sólido e apresenta ponto de fusão a 321°C e de ebulição a 767.2°C. É insolúvel na água e em solventes orgânicos usuais e oxida-se em presença do ar e humidade (Roman *et al.*, 2002).

Embora o Cd exista na composição natural dos solos, é a actividade antropogénica a principal responsável pelo aumento preocupante da concentração deste metal, nomeadamente em solos cultiváveis (Khan, 2005) (Figura 1.1). A indústria metalúrgica, o tráfego urbano e sistemas de aquecimento são exemplos de fontes antropogénicas de Cd (Benavides *et al.*, 2005).

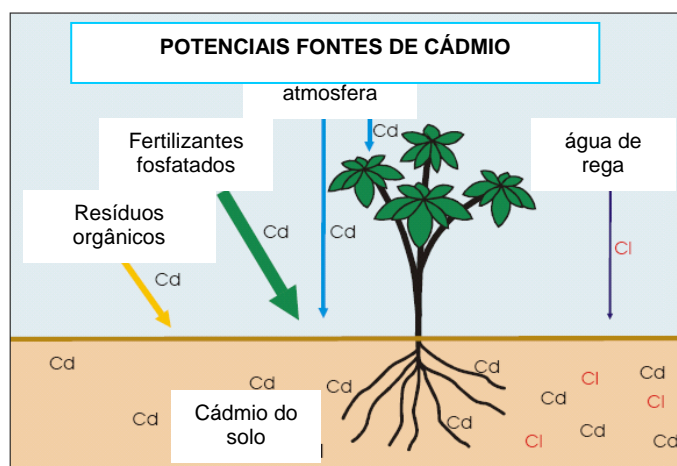


Figura 1.1 – Potenciais fontes de cádmio para as plantas (adaptado de <http://www.cpcb.nic.in/News%20Letters/Latest/cadmium/ch8-CADMIUM.htm>).

O Cd é um metal pesado considerado não essencial, embora recentemente tenha sido descrito um papel biológico na diatomácea marinha *Thalassiosira weissflogii* associado à interacção deste metal com a anidrase carbónica (Lane e Morel, 2000), sendo este o único papel biológico conhecido. Este metal tem merecido particular interesse dado o seu potencial citotóxico, mutagénico e carcinogénico nomeadamente em células animais (Filipic e Hei, 2004; Filipic *et al.*, 2006), a sua relativa mobilidade, e tempo de meia-vida biológico longo (cerca de 30 anos) (Filipic *et al.*, 2006). Para não fumadores e indivíduos que não estão ocupacionalmente expostos a dieta é a principal fonte de Cd (Filipic *et al.*, 2006) dado que é eficazmente absorvido por raízes de plantas como batateira, alface e cereais que fazem parte da dieta humana. A exposição aguda do Homem a este tóxico afecta os pulmões, tracto gastrointestinal, ossos, ovários e testículos (Hinkle, 1987). A

exposição crónica é responsável pelo aparecimento de uma doença óssea deformante – Itai-Itai –, descrita pela primeira vez por volta de 1910, (Roman *et al.*, 2002) podendo também causar danos renais graves (Hinkle, 1987).

O mecanismo de toxicidade do Cd apresenta alguns processos semelhantes nas células animais e nas células vegetais como os efeitos nos ácidos nucleicos, em proteínas, na expressão genética e na morte celular (e.g. morte celular programada) (Deckert, 2005). Contudo, este mecanismo não pode ser transposto linearmente das células animais para as vegetais. Células animais apresentam uma capacidade proliferativa anómala na presença deste metal levando ao desenvolvimento de processos carcinogénicos (Deckert, 2005). No entanto, esta proliferação anómala não se verifica em células vegetais, possivelmente devido a diferenças nomeadamente nos genes de regulação do ciclo celular e diferenças nos processos de resposta antioxidante (Deckert, 2005).

Interacção plantas – metal

A toxicidade de um composto químico e a sua absorção pela raiz da planta estão relacionadas com a forma na qual o composto está presente no meio, que é dependente do próprio composto e de características do solo (e.g. pH, concentração em outros iões, conteúdo em matéria orgânica) (Seregin e Ivanov, 2001).

Ao estudar toxicidade de metais pesados nas plantas devem-se considerar diferentes grupos de plantas que se distinguem pela sua capacidade de acumular metais: os acumuladores e os excludores. Os excludores impedem a entrada do metal na planta (Lasat, 2000). A quantidade de metais, como o Cd, que consegue entrar encontra-se usualmente na parte subterrânea da planta (Seregin e Ivanov, 2001). Os acumuladores, por sua vez, desenvolveram mecanismos que permitem a entrada e acumulação de níveis elevados de metal na planta (Lasat, 2000). Face ao perfil de resposta das plantas em relação ao metal podem-se ainda considerar espécies indicadoras (estas possuem fraco controlo dos processos de absorção e transporte de metais) (Lasat, 2000). Relativamente aos mecanismos envolvidos na absorção/acumulação de Cd, a entrada deste metal nas plantas é feita através de transporte passivo, contudo o transporte activo nomeadamente através de transportadores de outros catiões divalentes (Zn^{2+} , Fe^{2+} (Clemens, 2006)) não está excluído (Seregin e Ivanov, 2001). A interacção do Cd com os canais de cálcio foi comprovada para células animais por Hinkle *et al.* (1987). Estes

autores demonstraram que três classes de bloqueadores de canais de cálcio (dihidropiridinas, verapamil e diltiazem) interferiam na entrada de Cd nas células e que os canais de cálcio eram uma porta efectiva de entrada deste metal nas células. A interacção do Cd (e de outros metais bivalentes) com os transportadores de cálcio foi também descrita para algumas espécies vegetais (e.g. Zhao *et al.*, 2002; Clemens, 2006).

De modo a conseguirem adaptar-se e/ou sobreviver em condições de stress, nomeadamente em presença de xenobióticos como metais pesados, as plantas recorrem a diferentes estratégias (e.g. redução da absorção do metal, exclusão, segregação dos metais para compartimentos da célula metabolicamente inactivos, alterações metabólicas que diminuem os efeitos tóxicos do metal) (Seregin e Ivanov, 2001).

Para concentrações subletais a maior parte do Cd está localizada na rizoderme e no córtex e não atravessa a barreira da endoderme (Seregin e Ivanov, 2001). Uma vez dentro da célula grande parte dos metais encontra-se ligada a ácidos poligalacturónicos da parede celular e a diversos ligandos nos vacúolos (Seregin e Ivanov, 2001), que parecem ser os locais preferenciais para acumulação dos metais pesados (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999; Clemens, 2006). A capacidade das plantas sintetizarem moléculas que se vão ligar aos metais pesados (e.g. fitoquelatinas (PCs), metalotioninas (MTs)), transportando-os nomeadamente para os vacúolos diminui de forma muito significativa a concentração do metal no citoplasma, permitindo a manutenção do metabolismo usual sendo o potencial efeito tóxico desse(s) metal(ais) lateralizado/minimizado, podendo ser este um processo crucial para tolerância ao(s) metal(ais) (Seregin e Ivanov, 2001). As plantas conseguem, desta forma, contornar determinadas concentrações destes compostos, que de outro modo comprometeriam a sua viabilidade.

Nas plantas, a toxicidade do Cd manifesta-se visivelmente por clorose das folhas e inibição do crescimento, verificando-se também a inibição da abertura dos estomas (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). Este metal afecta o metabolismo do nitrogénio, a respiração e reduz a absorção de nutrientes pelas plantas (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). Os sintomas de toxicidade devidos ao excesso de Cd podem ainda traduzir-se nas plantas por indução ou inibição de enzimas, alteração do equilíbrio hídrico, efluxo de catiões e produção de radicais livres (Prasad, 1995).

Embora largamente estudado, o mecanismo de acção do Cd nas células vegetais é ainda pouco conhecido. Parte da heterogeneidade de respostas descritas na literatura referentes a efeitos na fisiologia e metabolismo vegetal pode dever-se à heterogeneidade

de espécies vegetais usadas, assim como às diferentes concentrações de Cd e condições experimentais usadas (tempo de exposição, cultura *in vitro* vs. *in vivo*; cultura hidropónica vs. cultura em solo).

Genotoxicidade

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar a toxicidade e nomeadamente a genotoxicidade de metais (e.g. Cd) em organismos vegetais.

Steinkellner *et al.* (1998) verificaram haver resposta genotóxica - aumento da frequência de micronúcleos - dependente da dose em células mãe dos grãos de pólen de *Tradescância* e células do meristema da raiz de *Allium cepa* e *Vicia faba* quando expostas a As^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} . Em *Hordeum vulgare* o Cd demonstrou provocar alterações no DNA em ápices de raiz (Liu *et al.*, 2005). Ünyayar *et al.* (2006) testaram diferentes concentrações de Cd em duas espécies distintas (*Allium sativum* e *Vicia faba*) tendo demonstrado que a frequência de micronúcleos (parâmetro de genotoxicidade) aumentou de forma considerável para uma concentração de 10 μM . Os mesmos autores verificaram que estas concentrações de Cd induzem citotoxicidade, nomeadamente stress oxidativo, através da produção de radicais livres e de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Figura 1.2).

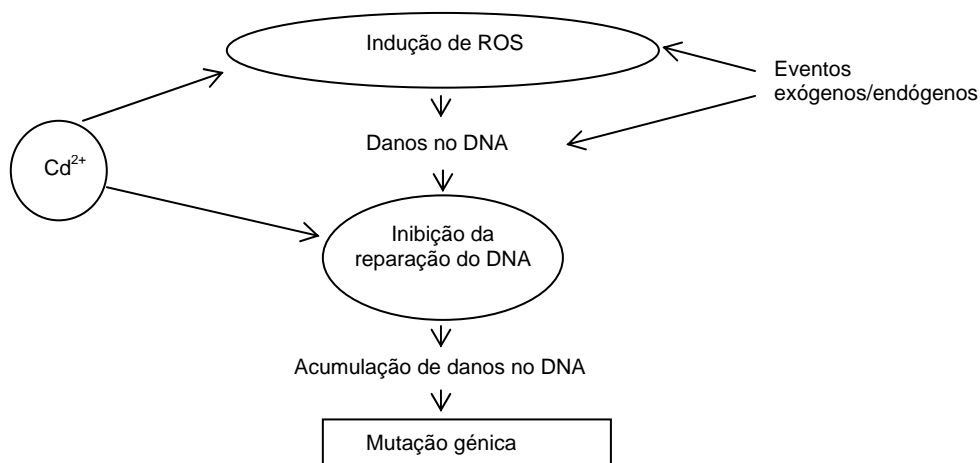


Figura 1.2 – Mecanismos propostos para a indução de mutagenese pelo cádmio. A acção do cádmio pode verificar-se quer através da indução da formação intracelular de ROS, que leva a

danos no DNA, quer inibindo os mecanismos de reparação do DNA (adaptado de Filipic *et al.*, 2006).

A interferência das espécies reactivas de oxigénio com lípidos, proteínas e ácidos nucleicos leva a peroxidação lipídica, inactivação de enzimas e danos membranares, comprometendo a viabilidade celular. Contudo, embora seja aceite que o Cd conduz a stress oxidativo, ao contrário de outros metais pesados este parece não actuar directamente na produção de espécies reactivas de oxigénio (e.g. via reacção Fenton) (Deckert, 2005).

Apesar de mecanismos de defesa/tolerância, nomeadamente os acima descritos, (que funcionam dentro de determinado intervalo de concentrações variável de metal para metal, de espécie para espécie, e de condições ambientais/experimentais) pequenas quantidades do metal pesado podem entrar no núcleo e noutros organelos (como mitocôndrias e cloroplastos), podendo originar efeitos tóxicos nestes, repercutindo-se esta toxicidade na resposta da planta (Seregin e Ivanov, 2001).

De acordo com Deckert (2005) a genotoxicidade causada pelo Cd em plantas poderá ser devida não só aos danos causados pelo ião Cd^{2+} no DNA, mas também à inactivação dos mecanismos de reparação do DNA.

O estudo do efeito de metais pesados (e.g. Cd) em *Boletus edulis* demonstra haver danos estruturais em lípidos e DNA (Collin-Hansen *et al.*, 2005). Por seu lado Monteiro *et al.* (2007a) demonstraram haver instabilidade de microssatélites e portanto genotoxicidade em raiz de alface (*Lactuca sativa*) exposta a cádmio ($10 \mu\text{M}$ $(\text{CdNO}_3)_2$) desde a germinação. No entanto, este efeito pode ser dependente da idade/estado de desenvolvimento da planta, dado que estes autores também expuseram plantas da mesma espécie mas com 5 semanas de idade às mesmas condições de Cd, não tendo sido observada genotoxicidade (Monteiro *et al.*, 2007b).

Técnicas mais usadas na detecção de genotoxicidade

Embora a morfologia seja um aspecto fenotípico deveras importante em estudos de toxicidade caminha-se no sentido de uma análise mais detalhada, que permita uma detecção precoce (nomeadamente combinando parâmetros fenotípicos com genéticos). Esta detecção precoce permite, no caso particular de estudos ecotoxicológicos, a

avaliação/intervenção antes do ecossistema em estudo estar irremediavelmente afectado.

Assim, as técnicas clássicas (e.g. mortalidade, crescimento, fisiologia, uso de biomarcadores) de avaliação ecotoxicológica devem associar-se, de modo complementar, técnicas moleculares/-ómicas que permitam verificar/rastrear, por exemplo, se há ocorrência de mutagenicidade/genotoxicidade, permitindo integrar programas de prevenção/intervenção atempada no ecossistema.

Os efeitos genotóxicos podem dividir-se em alterações de ploidia (detectáveis por exemplo por citometria de fluxo ou por técnicas citogenéticas), alterações cromossómicas (detectáveis por exemplo por técnicas citogenéticas) ou ainda na sequência da cadeia de DNA. Estas últimas são frequentemente detectadas por utilização de marcadores moleculares como, por exemplo, os AFLP (**a**mplified **f**ragment **l**ength **p**olymorphism), RFLP (**r**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism), SSRs (**s**imple **s**equences **r**epeats) e RAPDs (**r**andom **a**mplified **p**olymorphic **D**NAs).

Várias destas técnicas foram já usadas no rastreio de genotoxicidade induzida por metais em geral e Cd em particular (Labra *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2007a; Monteiro *et al.*, 2007b). No entanto, e como salienta Smulders (2005), a informação dada por estes marcadores individualmente é limitada, e restringida à(s) sequência(s) de nucleótidos avaliada(s). Assim este autor recomenda a utilização de uma bateria, o mais alargada possível, combinando várias técnicas moleculares.

As diversas técnicas moleculares disponíveis podem ser usadas para variadíssimas finalidades como mapeamento do genoma, obtenção da “impressão digital” do DNA, (Gupta e Varshney, 2000), em toxicologia ambiental (Liu *et al.*, 2005) e mesmo como marcadores de alto risco no cancro (Maehara *et al.*, 2001).

Descrever-se-ão, em seguida, os fundamentos básicos de algumas técnicas com potencial aplicação na avaliação de genotoxicidade, nomeadamente os microssatélites que foram utilizados como marcadores moleculares neste trabalho (Capítulo II).

Polimorfismo da Dimensão dos Fragmentos de Restrição ou RFLPs

Nesta técnica - polimorfismo da dimensão dos fragmentos de restrição ou RFLP – os fragmentos resultantes da digestão do DNA com enzimas de restrição são separados em gel de electroforese (Karp *et al.*, 1996) e transferidos para uma membrana. A hibridização, recorrendo a fragmentos de DNA marcado permite a revelação, sendo

depois comparada com um padrão. Permite uma ampla cobertura do genoma e a reutilização de membranas, no entanto o facto de requerer pessoal qualificado, mão-de-obra intensiva e ainda o facto de não haver uma biblioteca de sondas disponível são limitações consideráveis.

Reacção em Cadeia da Polimerase ou PCR

O desenvolvimento da reacção em cadeia da polimerase (PCR – **p**olymerase **c**hain **r**eaction) permitiu ultrapassar algumas limitações dos RFLPs (Karp *et al.*, 1996) e foi o rastilho para tornar corrente o uso de técnicas moleculares. Esta técnica, merecedora do prémio Nobel da Química em 1993, permite o aumento rápido da quantidade de um determinado fragmento de DNA *in vitro* (Lima e Mota, 2003). Na figura 1.3 é possível observar de forma simplificada os três passos principais da reacção em cadeia da polimerase.

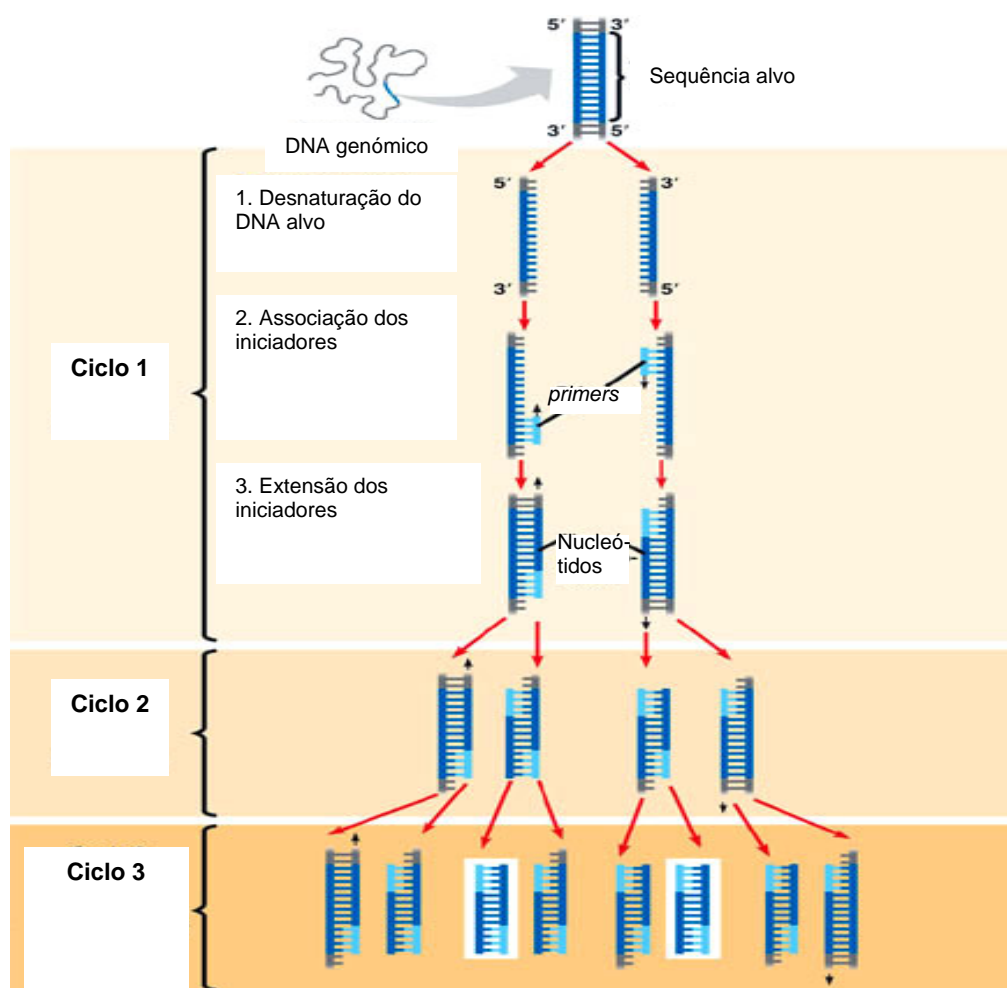


Figura 1.3 - Amplificação do DNA através da reacção em cadeia da polimerase (PCR) (adaptado de: fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm).

Para que ocorra a reacção em cadeia da polimerase tem que se dispor de: a) cadeia dupla de DNA (contendo a sequência alvo a ser copiada); b) uma polimerase termoestável (e.g. *Taq* polimerase); c) oligonucleótidos iniciadores (*primers*); d) os quatro trifosfatos de nucleósido (ATP, GTP, CTP e TTP) e e) Mg^{2+} num tampão adequado ao processo (Lima e Mota, 2003).

Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso ou RAPDs

Outra técnica molecular muito usada denomina-se RAPDs e tem por base a utilização de oligonucleótidos (10-20 nucleótidos) aleatórios como iniciadores, que são hibridizados a baixa temperatura, permitindo a amplificação de diversas regiões do genoma (Lima e Mota, 2003). Embora possa ser pouco reprodutível, o facto de não exigir o conhecimento prévio de qualquer região do genoma (Lima e Mota, 2003), de ser de execução muito simples e pouco dispendiosa é vantajoso. Esta técnica pode ser usada para detecção de efeitos genotóxicos devido a contaminação com Cd em plantas (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados ou AFLPs

A técnica de AFLPs, por sua vez requer uma primeira dupla digestão do DNA por enzimas de restrição, seguida de amplificação por PCR dos fragmentos (Karp *et al.*, 1996). Os produtos obtidos são marcados radioactivamente ou através de fluorescência e separados por electroforese (Karp *et al.*, 1996). É uma técnica dispendiosa e de execução complexa, no entanto permite detectar um elevado número de *loci*, tem elevado poder de detecção de variabilidade genética e permite impressões digitais de DNA de complexidade elevada (Jones *et al.*, 1997). Tem também como vantagens a elevada resolução e reprodutibilidade. Esta técnica tem também sido utilizada em plantas em toxicologia ambiental (Labra *et al.*, 2004).

Microsatélites

Microsatélites são sequências curtas (1-6 pb) repetidas em *tandem* distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotas (Gupta *et al.*, 1996). Apresentam comportamento co-dominante (Gupta *et al.*, 1996) (podendo os heterozigotos ser identificados) e alto grau de polimorfismo (Jones *et al.*, 1997). Os microsatélites são

considerados marcadores moleculares muito eficientes, mas o seu desenvolvimento é demorado e dispendioso (Rakoczy-Trojanowska e Bolibok, 2004).

Estudos com níquel (metal pesado) demonstraram, em linhas celulares humanas, que este composto pode induzir instabilidade genómica, detectável por avaliação de microssatélites (Zienolddiny *et al.*, 2000).

Trabalhos recentes demonstram o uso de SSRs, com sucesso na avaliação de mutagénese/genotoxicidade de plantas (Monteiro *et al.*, 2007c; Paiva *et al.*, 2006).

Segundo Gupta e Varshney (2000) a utilização de marcadores moleculares baseados em PCR (e.g. RAPDs, AFLPs, microssatélites) deve ser preferida em relação aos marcadores baseados em hibridação de sequências de DNA como RFLPs.

Outras técnicas para avaliação de alterações no DNA

As técnicas moleculares são frequentemente complementadas por outras técnicas informativas de alterações no DNA. Destacam-se algumas:

O ensaio cometa (Comet assay) consiste de um modo muito simples na encapsulação de células numa suspensão de agarose seguida de lise celular e electroforese. A coloração definida na técnica permite a visualização da migração do DNA (quando há danos no DNA este tem uma migração diferenciada sendo observável estruturas semelhantes à forma de cometas) (Cotelle e Férard, 1999). Este ensaio pode ser usado num vasto leque de espécies animais e vegetais, permitindo detectar danos no DNA em células individuais. É utilizado em estudos de toxicologia genética e ecotoxicologia genética (Cotelle e Férard, 1999), de modo a detectar genotoxicidade de alguns xenobióticos presentes no ambiente. Este ensaio demonstrou ser sensível e rápido na avaliação de genotoxicidade ambiental (Cotelle e Férard, 1999).

Quando há um fragmento de cromossoma que não é incorporado no núcleo da célula filha, durante a divisão celular, observa-se um pequeno núcleo que se denomina micronúcleo. O ensaio de micronúcleos (MN) (os micronúcleos só podem ser observados após ocorrência de divisão celular) permite avaliar, recorrendo a critérios morfológicos, citotoxicidade e genotoxicidade (e.g. quebra de cromossomas, perda de cromossomas, inibição da divisão celular, apoptose, necrose) (Fenech, 2000). O facto de permitir a medição fiável da quebra e perda de cromossomas faz desta técnica uma das preferidas

para avaliação de danos no DNA a nível cromossómico (Fenech, 2000). Algumas aplicações frequentes prendem-se com a avaliação de danos genéticos em monitorização de populações bem como com a avaliação do potencial genotóxico de alguns xenobióticos (Fenech, 2000).

A citometria de fluxo analisa partículas (e.g. núcleos ou células) marcadas com fluorocromos específicos para o DNA, quando estas fluem individualmente numa suspensão a alta velocidade e são intersectadas por uma fonte de luz (Loureiro e Santos 2004). O fluorocromo que marca o DNA fluoresce noutra comprimento de onda, e a intensidade desta fluorescência pode então ser usada para quantificar o DNA do núcleo e o nível de ploidia das células assim como a percentagem de núcleos que estão nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2) (Loureiro e Santos 2004). Assim, esta técnica tem sido recentemente usada na análise de efeitos genotóxicos por detecção rápida de variações de níveis de ploidia (e.g. aneuploidização ou poliploidização) ou de potenciais efeitos clastogénicos (degradação do DNA), ou ainda efeitos mitogénicos (efeitos no ciclo celular) (e.g. Rayburn e Wetzel, 2002).

O género *Thlaspi* como modelo na avaliação de toxicidade de metais e estudos de fitorremediação

Na tentativa de minimizar e reaproveitar, ou tornar reutilizáveis (e.g. do ponto de vista agrícola) solos contaminados com metais (ou outros contaminantes), a área científica da remediação de solos tem ganho, nos últimos anos, particular importância. Contudo, os tratamentos físicos e químicos disponíveis, para além de serem dispendiosos, podem ter grande impacto nos solos tratados (Khan, 2005) e consequentemente nos ecossistemas.

A biorremediação (entre as quais se destaca a fitorremediação) pode ser uma alternativa mais viável na descontaminação de solos (Lasat, 2000). A fitorremediação é um processo biotecnológico que utiliza as plantas como agentes principais para recuperar águas e solos contaminados por diversos poluentes, nomeadamente metais (Pb, Zn, Cu, Ni, Hg, Se), permitindo a remoção, transferência ou simplesmente a estabilização do contaminante (Khan, 2005). A constatação que a zona radicular das plantas (rizosfera) apresenta a capacidade de biotransformar moléculas orgânicas, permitindo a utilização de moléculas poluentes como fonte de nutrientes para os microorganismos do ecossistema (Khan, 2005) deu novo impulso a esta área.

Vários estudos têm sido feitos, na perspectiva de rentabilizar os diferentes processos de fitorremediação. Por exemplo, a adição de agentes quelantes sintéticos como a EDTA a solos poluídos por metais parece contribuir para uma maior absorção nomeadamente de Cd e Pb por parte das plantas (Seregin e Ivanov, 2001). Contudo, a adição de químicos para descontaminação pode ser questionável do ponto de vista ambiental. Por outro lado, entre as estratégias de rentabilização podem incluir-se os estudos para selecção de espécies mais indicadas para o metal/solo a descontaminar, entre as quais se destaca o potencial da *Thlaspi caerulescens* (Escarré *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2006).

Algumas plantas, capazes de acumular níveis extraordinariamente elevados de metais, são denominadas hiperacumuladoras (Lasat, 2002). A *Thlaspi caerulescens* (Figura 1.4), hiperacumuladora de Cd, Zn e Ni (Assunção *et al.*, 2006), é uma herbácea anual ou vivaz de curta duração (Escarré *et al.*, 2000), membro da família Brassicaceae (Pence *et al.*, 2000) e tem uma distribuição geográfica vasta, nomeadamente na Europa (pode ser encontrada da Escandinávia ao Mediterrâneo e da Europa central aos Alpes e Pirinéus)(Koch *et al.*, 1998).



Figura 1.4 - *Thlaspi caerulescens*. a) Pormenor (adaptado de www.treehugger.com/.../04/theres_gold_in.php); b) (adaptado de www.petzi.org/thlaspi/tcae1.jpg).

Pode ser classificada como metalófita facultativa (Dechamps *et al.*, 2005). O facto de crescer naturalmente em solos contendo níveis elevados de metais pesados como Zn, Pb, Cd, Ni, Cr e Co tem despertado o interesse da comunidade científica sendo objecto de inúmeros estudos.

As plantas hiperacumuladoras, entre as quais a *T. caerulescens*, são usualmente plantas de pequeno porte e crescimento relativamente lento, o tem limitado as aplicações. O desenvolvimento de áreas como a genética e a biologia molecular permitiu aumentar o

conhecimento sobre os mecanismos de acumulação bem como identificar os genes responsáveis por essa acumulação. A incorporação de genes responsáveis pela hiperacumulação em plantas de crescimento mais rápido e de grande porte de modo a conseguir aumentar a rentabilidade e diminuir os custos deste tipo de fitorremediação (fitoextração) é promissora e tem despertado interesse dos estudiosos na última década (e.g. Martínez *et al.*, 2006).

A capacidade de hiperacumular da *T. caerulescens* é extremamente variável, dependendo não só do ecotipo (alguns são capazes de acumular até 10 000 mg Cd/Kg na parte aérea (matéria seca), em cultura hidropónica, sem efeitos fitotóxicos) (Zhao *et al.*, 2002) como também do pH e da textura do solo (Yanai *et al.*, 2006). A *T. caerulescens* pode acumular até 30 000 µg Zn/g e 10 000 µg Cd/g na parte aérea (peso seco) (Deniau *et al.*, 2006), sendo prometedora na área da fitorremediação, via fitoextração.

Estão descritos para esta espécie vários ecotipos com diferentes perfis de resposta ao Cd (e.g. Zhao *et al.*, 2002). A compreensão da variabilidade intrínseca aos ecotipos é essencial para conseguir prever e rentabilizar a fitoextração e têm sido desenvolvidos estudos neste sentido (e.g. Dechamps *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2006). Nesta perspectiva Zhao *et al.* (2002) comparou dois ecotipos de *T. caerulescens* em relação à entrada/acumulação de Cd: o ecotipo Ganges (hiperacumulador mais eficaz) e o ecotipo Prayon (menor capacidade acumuladora). Estes autores sugeriram que no ecotipo Prayon a entrada de Cd é feita essencialmente por canais de cálcio, enquanto no ecotipo Ganges parece existir um transportador altamente selectivo de Cd. Para além disso, o ecotipo Ganges (dados os níveis elevados de hiperacumulação) parece ser um bom modelo de estudo para o mecanismo de hiperacumulação e parece também ser promissor para fitorremediação (Zhao *et al.*, 2002).

Outros aspectos que se prendem com a translocação/alocação do Cd (e outros metais) nas plantas e com os mecanismos de (hiper)acumulação ainda não são completamente conhecidos e têm sido objecto de interesse (e.g. Salt *et al.*, 1999; Nedelkoska e Doran, 2000; Pence *et al.*, 2000; Papoyan e Kochian, 2004; Cosio *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2007).

Na espécie *T. caerulescens*, hiperacumuladora para Zn/Cd, Pence *et al.* (2000) demonstraram que o aumento de absorção de Zn se devia ao aumento de expressão de um gene transportador de Zn (ZNT1) e que este parece estar relacionado com a absorção não só de Zn (alta afinidade), mas também de Cd (baixa afinidade).

Para além da *T. caerulescens*, e na tentativa de compreender melhor o mecanismo envolvido na hiperacumulação, outras espécies de *Thlaspi* têm sido usadas, nomeadamente em estudos comparativos de resposta (e.g. acumulação/tolerância) a metais (e.g. Hammond *et al.*, 2006; Tolrá *et al.*, 2006).

No presente trabalho, procede-se a uma análise comparativa de instabilidade genética em duas espécies de *Thlaspi* expostas a cádmio, utilizando uma espécie hiperacumuladora (*T. caerulescens*) e uma não acumuladora (*T. arvense*) (Figura 1.5).



Figura 1.5 - a) *Thlaspi arvense* (adaptado de www.gatesheadbirders.co.uk/Flora/Flora%202003...);
b) Pormenor de *Thlaspi arvense* (adaptado de bellquel.bo.cnr.it/.../Crocifere/).

Objectivo

O objectivo do trabalho integra-se na área da ecotoxicologia vegetal. Nesta linha de estudo pretende-se avaliar se a exposição a cádmio induz instabilidade genética em *Thlaspi arvense* (não acumuladora de cádmio) e/ou em *Thlaspi caerulescens* (hiperacumuladora de cádmio). Para realizar o estudo comparativo de genotoxicidade proposto efectuou-se a avaliação da instabilidade de microssatélites.

Deve salientar-se que este é um estudo comparativo, em que se pretende analisar as diferenças ou semelhanças entre duas espécies relacionadas, nas quais o comportamento é distinto em relação à acumulação de cádmio.

Partindo de alguns princípios levantaram-se questões, às quais se procura dar resposta:

- 1) O cádmio afecta o crescimento das plantas. O crescimento de *T. arvense* e *T. caerulescens* é afectado de forma diferente?
- 2) A toxicidade do cádmio manifesta-se morfológicamente (e.g. clorose das folhas). A resposta de *T. arvense* e *T. caerulescens* é morfológicamente distinta?

- 3) Usualmente o conteúdo de cádmio é maior na raiz mas tem expressão considerável nas folhas. Nas hiperacumuladoras a translocação do metal absorvido para a parte aérea tem significativa importância. O padrão de partição do cádmio acumulado nas duas espécies é similar?
- 4) O cádmio é genotóxico e mutagénico. A mutagénese é indicativa de instabilidade genética e pode ser avaliada por microssatélites. Nas condições de estudo, há instabilidade genética, identificável por instabilidade de microssatélites (MSI) em *T. arvense*? E em *T. caerulescens*?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❑ ANTUNES, S. C.; FIGUEIREDO, D. R.; MARQUES, S. M.; CASTRO, B. B. ; PEREIRA, R. and GONÇALVES, F.. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. **Science of The Total Environment**, vol. 374, issues 2-3, (March 2007), pp. 252-259.
- ❑ ASSUNÇÃO, Ana G. L.; PIEPER, Bjorn; VROMANS, Jaap; LINDHOUT, Pim; AARTS, MARK G. M.; SCHAT, Henk. Construction of a genetic linkage map of *Thlaspi caerulescens* and quantitative trait loci analysis of zinc accumulation. **New Phytologist**, 170, (2006), pp. 21-32.
- ❑ BENAVIDES, Maria P.; GALLEGÓ, Susana M.; TOMARO, Maria L.. Cadmium toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol**, 17 (1), (2005), pp. 21-34.
- ❑ CLEMENS, S..Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Science Direct – Biochimie**, 88, (2006), pp. 1707-1719.
- ❑ COLLIN-HANSEN, Christian ; ANDERSEN, Rolf A. and STEINNS, Eiliv. Damage to DNA and lipids in *Boletus edulis* exposed to heavy metals. **Mycol. Res.**, 12, (December 2005), pp. 1386-1396.
- ❑ COSIO, Claudia; DESANTIS, Laura; FREY, Beat; DIALLO, Saliou; KELLER, Catherine. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, vol. 56, n.º 412, (February 2005), pp. 765-775.
- ❑ COTELLE, S. and FÉRARD, J. F.. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 34, (1999), pp. 246-255.
- ❑ DECHAMPS, Caroline; ROOSENS, Nancy H.; HOTTE, Céline; MEERTS, Pierre. Growth and mineral element composition in two ecotypes of *Thlaspi caerulescens* on Cd contaminated soil. **Plant and soil**, 273, (2005), pp. 327-335.
- ❑ DECKERT, Joanna. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? **Biometals**, 18, (2005), pp. 475-481.
- ❑ DENIAU, A. X.; PIEPER, B.; BOOKUM, W. M. Ten; LINDHOUT, P.; AARTS, M.G. M.; SCHAT, H.. QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Theor Appl Genet**, 113, (2006), pp. 907-920.
- ❑ ESCARRÉ, J.; LEFÈVRE, C.; GRUBER, W. ; LEBLANC, M. ; LEPART, J. ; RIVIÈRE, Y. ; DELAY, B.. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi*

- caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implication for phytoremediation. **New Phytol**, 145, (2000), pp. 429-437.
- ❑ FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455, (2000), pp. 81-95.
 - ❑ FILIPIC, M; FATUR, T; VUDRAG,M.. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. **Human & Experimental Toxicology**, 25, (2006), pp. 67-77.
 - ❑ FILIPIC, Metka and HEI, Tom K.. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, 546, (2004), pp. 81-91.
 - ❑ GRISPEN, Veerle M.J., NELISSEN, Hans J.M., VERKLEIJ, Jos A.C.. Phytoextraction with *Brassica napus* L.: A tool for sustainable management of heavy metal contaminated soils. **Environmental Pollution**, 144, (2006), pp.77-83.
 - ❑ GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C. and RAMESH, B.. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers (Review article). **Current science**, vol. 70, n.º1, (January 1996).
 - ❑ GUPTA, P. K. and VARSHNEY, R. K.. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, 113, (2000), pp. 163-185.
 - ❑ HAMMOND, John P.; BOWEN, Helen, C.; WHITE, Philip J.; MILLS, Victoria; PYKE, Kevin A.; BAKER, Alan J. M.; WHITING, Steven N.; MAY, Sean T. and BROADLEY, Martin R.. A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. **New Phytologist**, 170, (2006), pp. 239-260.
 - ❑ HINKLE, Patricia M.; KISELLA, Patricia A. and OSTERHOUDT, Kevin C.. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, n.º 34, (1987), pp. 16333-16337.
 - ❑ JONES, Neil; OUGHAM, Helen; THOMAS, Howard. Markers and mapping: we are all geneticists now. **New Phytol**, 137, (1997), pp. 165-177.
 - ❑ KARP, Angela; SEBERG, Ole; BUIATTI, Marcello. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, 78, (1996), pp. 143-149.
 - ❑ KHAN, Abdul G..Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 18, (2005), pp. 355-364.
 - ❑ KOCH, M. Systematics and evolutionary history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in Western Europe evidence from genetic studies based on isozyme analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 26, issue 8, (1998), pp. 823-838.

-
- ❑ LABRA, Massimo; GRASSI, Fabrizio; IMAZIO, Serena; DI FABIO, Tiziana; CITTERIO, Sandra; SGORBATI, Sergio; AGRADI, Elisabetta. Genetic and DNA-Methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L.. **Chemosphere**, 54, (2004), pp. 1049-1058.
 - ❑ LANE, Todd W.; MOREL, M. M. François. A Biological function for cadmium in marine diatoms. **PNAS**, vol. 97, n.º 9, (April 2000), pp. 4627-4631.
 - ❑ LASAT, M M.. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **J. Environm. Qual.**, vol. 31, (2002), pp. 109-120.
 - ❑ LASAT, M. M.. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/ metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazourds Substance Research**, vol. 2, (2000).
 - ❑ LIMA, Nelson; MOTA, Manuel. Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações. **LIDEL**, (2003).
 - ❑ LIU, Wan; YANG, Q. Zhou; XIE, L.; LI, P.; SUN, T.. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oriza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. **Chemosphere**, vol. 67, issue 6, (2007), pp. 1155-1163.
 - ❑ LIU, Wan; LI, P. J.; QI, X. M.; ZHOU, Q. X.; ZHENG, L.; SUN, T.H.; YANG, Y.S.. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. **Chemosphere**, (2005).
 - ❑ LOUREIRO, João; SANTOS, Conceição. Métodos em Biotecnologia – Citometria de fluxo I – Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, (2004).
 - ❑ MAEHARA, Yoshihiko; ODA, Shinya; SUGIMACHI, Keizo. The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability (mini review). **Mutation Research**, 461, (2001), pp. 246-263.
 - ❑ MARTINEZ, Mar; BERNAL, Pilar; ALMELA, Concepcion; VÉLEZ Dinoraz,, GARCIA-AGUSTIN, Pilar; SERRANO Ramón; NAVARRO-AVIÑÓ, Juan. An engineered plant that accumulates higher levels higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. **Chemosphere**, 64, (2006), pp. 47-485.
 - ❑ MONTEIRO, M.; PAIVA, C.; SOARES, A.M.V.M.; MANN, R.M.; SANTOS, C. and LOPES, T.. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. **Setac**, Porto, Portugal (20-24 May 2007). a)

- ❑ MONTEIRO, M.; SANTOS, C; MANN, R.M.; SOARES, A.M.V.M. and LOPES, T.. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. Using nuclear microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**, 60 (3), (2007), pp. 421-427. b)
- ❑ NEDELKOSKA, Tatjana V.; DORAN, Pauline M.. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. **Biotechnology and bioengineering**, vol. 67, n.º 5, (March 5, 2000).
- ❑ PAIVA, C.; MONTEIRO, Marta; SANTOS, Conceição; LOPES, Tina. Evaluation of microsatellite instability (MSI) in *Lactuca sativa* exposed to cadmium. **Congresso de Bioquímica**, Universidade de Aveiro, Portugal, (2006).
- ❑ PAPOYAN, Ashot and KOCHIAN, Leon V.. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transport ATPase. **Plant Physiology**, vol. 136, (Novembro 2004), pp.3814-3823.
- ❑ PENCE, Nicole S.; EBBS, Stephen D. ; LETHAM, Deborah L. D.; LASAT, Mitch M.; GARVIN, David F.; EIDE, David; KOCHIAN, Leon V.. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn / Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **PNAS**, vol. 97, n.º 9, (April 2000), pp. 4956-4960.
- ❑ PEREIRA, R.; RIBEIRO, R. and GONÇALVES, F.. Risk Around The world – Plan for na integrated Human and Environmental risk assessment in the S. Domingos Mine Area (Portugal). **Human and Ecological Risk Assessment**, 10, (2004), pp. 543-578.
- ❑ PEREIRA, R.; SOUSA, J. P.; RIBEIRO, R. and GONÇALVES, F.. Microbial Indicators in Mine Soils (S. Domingos Mine, Portugal). **Soil & Sediment Contamination**, 15, (2006), pp. 147-167.
- ❑ PLAZA, Sonia; TEARALL, Kathryn; ZHAO, Fang-Jie; BUCHNER, Peter; MCGRATH, Steve P.; HAWKESFORD, Malcolm J.. Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, vol. 58, n.º 7, (2007), pp. 1717-1728.
- ❑ PRASAD, M. N. V..Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 35, n.º4, (1995), pp. 525-545.
- ❑ RAKOCZY-TROJANOWSKA, Monika; BOLIBOK, Hanna. Characteristics of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, vol. 9, (2004), pp. 221-230.

-
- ❑ RAYBURN, A. Lane; WETZEL, J. B.. Flow cytometric analyses of intraplant nuclear DNA content variation induced by sticky chromossomes. **Cytometry**, vol. 49, issue 1, (Sep 2002), pp. 36-41.
 - ❑ ROMAN, Trindade Rodrigues Nobalbos; LIMA, Édimo Garcia de; AZOUBEL, Reinaldo; BATIGÁLIA, Fernando. Toxicidade do Cádmio no Homem. **HB Científica**, vol. 9, n.º1, (Janeiro-Abril 2002).
 - ❑ SALT, David E.; PRINCE, Roger C.; BAKER, Alan J. M.; RASKIN, Ilya; PICKERING, Ingrid J.. Zin ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, vol. 33, n.º 5, (1999), pp. 713-717.
 - ❑ SANITÀ Di TOPPI, L. and GABRIELLI, R.. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 41, (1999), pp. 105-130.
 - ❑ SCHWARTZ, Christophe; SIRGUEY, Catherine; PERONNY, Sylvie; REEVES, Roger D.; BOURGAUD, Frédéric; MOREL, Jean Louis. Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. **International Journal of Phytoremediation**, 8, (2006), pp. 339-357.
 - ❑ SEREGIN, I. V. and IVANOV, V. B.. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, vol. 48, n.º4, (2001), pp. 606-630.
 - ❑ SMULDERS, M.J.M.. Are there adequate methods for assessing somaclonal variation in tissue culture-propagated plants? Book of abstracts, COST 843 Final conference / COST 851 Joint Meeting (Slovakia), (June 28 – July 3, 2005), pp. 201-203.
 - ❑ STEINKELLNER, Hans; MUN-SIK, Kong; HELMA, Christoph; ECKER, Sonja; MA, Te-Hsiu; HORAK, Othmar; KUNDI, Michael and KNASMÜLLER, Siegfried. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and molecular mutagenesis**, 31, (1998), pp. 183-191.
 - ❑ TOLRÀ, Roser; PONGRAC, Paula; POSCHENRIEDER, Charlotte; VOGELMIKUS, Katarina; REGVAR, Marjana; BARCELÓ, Juan. Distinctive effects of cadmium on glucosinolate profiles in Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. **Plant Soil**, 288, (2006), pp. 333-341.
 - ❑ USA Occupational Safety and Health Administration, 2005 www.osha.gov/SLTC/cadmium.

- ÜNYAYAR, Serpil; ÇELİK, Ayla; ÇEKİÇ F. Özlem, GÖZEL, Aysin. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, vol. 21, n.º1, (2006), pp. 77-81.
- YANAI, Junta; ZHAO, Fang-Jie; McGRATH, Steve P.; KOSAKI, Takashi. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Environmental Pollution**, 139, (2006), pp. 167-175.
- ZHAO, Fang-Jie; HAMON, Rebecca E.; LOMBI, Enzo; McLAUGHLIN, Mike J. and McGRATH, Steve P..Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, vol. 53, n.º 368, (March, 2002), pp. 535-543.
- ZIENOLDDINY, Shanbeh; SVENDSRUD, Debbie, H.; RYBERG, David; MIKALSEN, Aase B.; HAUGEN, Aage. Nickel (II) induces microsatellite mutations in human lung cancer cell lines. **Mutation Research**. 452, (2000), pp. 91-100.

CAPÍTULO II

EFEITOS FISIOLÓGICOS E GENOTÓXICOS DO CÁDMIO EM *THLASPI ARVENSE* E *THLASPI CAERULESCENS*

Capítulo em preparação para submeter como artigo original a uma revista
ISI-SCI

Paiva, C *et al.* 2008. Physiological and genotoxic effects of cadmium in
hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species (*em preparação*).

PHYSIOLOGICAL AND GENOTOXIC EFFECTS OF CADMIUM IN HYPERACCUMULATOR AND NON-ACCUMULATOR *THLASPI* SPECIES

Catarina Paiva, Tina Lopes, Marta Monteiro, Conceição Santos

Cesam & Department of Biology, Laboratory of Cytometry and Biotechnology, University Aveiro,
3810-193, Aveiro, Portugal

Contact author: csantos@ua.pt

Abstract

Cadmium (Cd) is a non-essential element and is a widespread environmental pollutant. Exposure to Cd can result in cytotoxic, carcinogenic and mutagenic effects. Mutagenesis can be assayed with the use of molecular techniques such as microsatellites and, measuring genetic instability may be a powerful complement in toxicological evaluations. In this study the mutagenic/genotoxic effects of cadmium were evaluated in two species of the genus *Thlaspi*, the Cd hyperaccumulator alpine pennycress (*T. caerulescens*) and the non-accumulator field pennycress (*T. arvense*). Plant seeds were placed in filter paper imbibed in distilled water with 0 and 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ for germination. Six-day old plantlets were grown on Rorison solution supplemented with the same concentrations of cadmium for 22 days. At the end of the exposure, plants were harvested, and root and shoot lengths, as well as Cd accumulation, were measured. Cd-exposed plants of *T. arvense* showed chlorotic expanded leaves, lower growth and Cd accumulated mostly in roots. Whereas, Cd-exposed plants of *T. caerulescens* presented no significant differences in leaf morphology or growth, and Cd accumulated preferentially in leaves. Genomic DNA was extracted from roots of both species and microsatellites (SSRs) were then amplified in order to evaluate genetic instability, but no genetic instability was observed. Data show that for these species and for the Cd exposure conditions tested, Cd does not induce microsatellite instability. However, the use of other molecular markers is required in order to complement this study.

Keywords: *Thlaspi arvense*, *Thlaspi caerulescens*, microsatellites, genetic instability.

Introduction

Over the last few years metals such as lead, arsenic, cadmium and zinc are being added continuously mostly by anthropogenic sources, such as agrochemicals usage and long-term application of urban sewage sludge in agricultural soils, industrial activities (e.g. waste disposal, waste incineration and vehicle exhausts) (Khan, 2005), becoming sources of serious environmental and health hazards.

Many agricultural soils show a concerning contamination with heavy metals and the remediation of such soils is receiving increasing attention (Khan, 2005). The use of plants to clean up contaminated areas – phytoremediation - is emerging as an economic and environmental friendly way to recover these soils (Lasat, 2000).

Cadmium is a non-essential and toxic metal (Jiang *et al.*, 2005). Human chronic exposure to low doses of cadmium results in damage to kidneys and acute exposure to high doses causes damage to a number of organs including the lungs, gastrointestinal tract, the ovaries and testes and the bones (Hinkle *et al.*, 1987). Furthermore, because of its mutagenicity/genotoxicity (Filipic and Hei, 2004; Ünyayar *et al.*, 2006) and its long biological half-life (Filipic *et al.*, 2006) Cd is considered one of the most poisonous environmental substances. Food chain is the principal pathway of Cd exposure for most human beings (Filipic *et al.*, 2006) because it can be absorbed by plant roots and be concentrated by a number of crops that are part of the human daily dietary as lettuce, potatoes, fruits and many others.

The degree to which higher plants are able to take up metals (e.g. cadmium) depends on different factors (e.g. concentration in the soil and its bioavailability, modulated by the presence of organic matter, pH, concentration of other elements) (Seregin and Ivanov, 2001). Cd in plants causes leaf roll and chlorosis and reduces growth both in roots and in stems/shoots (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999; Azevedo *et al.*, 2005a). It inhibits the stomatal opening and can also cause inhibition of photosynthesis (e.g. Azevedo *et al.*, 2005a), respiration, nitrogen metabolism, decrease of water and mineral uptake (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999; Azevedo 2005b).

Besides these plant physiological aspects, Cd may also induce citotoxicity (e.g. increase of oxidative stress or interaction with SH-groups affecting enzyme activities) and genotoxicity. Ünyayar *et al.* (2006) have shown that Cd may lead to an increase of lipid

peroxidation and also found increase of micronuclei and reduction of mitotic index, suggesting that these last effects could be due to Cd-induced oxidative stress. Azevedo *et al.* (2005c) also described increased oxidative stress together with loss of membrane integrity. Filipic and Hei (2004) have already suggested the involvement of ROS in the genotoxicity of Cd compounds. Direct inhibition of DNA mismatch repair has also been suggested as another mechanism of Cd induced genotoxicity (Jin *et al.*, 2003).

Concerning the potential mutagenic effects induced by Cd (and/or metals in general), molecular techniques are valuable tools in assessing changes in specific DNA sequence regions. Microsatellites are a class of repetitive DNA sequences present in all living organisms. (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004). This characteristic of microsatellites and their high level of allelic variation, co-dominant mode of inheritance and potential for automated analysis have made them an important tool for researchers (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004). Microsatellites are tandem repeats of DNA sequences of only a few base pairs (1-6 bp) in length (Gupta *et al.*, 1996). SSRs (simple sequences repeats) are a type of microsatellites which are amplified in a PCR reaction with the use of primers complementary to its flanking regions, this way only small amounts of tissue are required (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004). Another advantage of these molecular markers is that microsatellite primers developed for one species frequently amplify loci in related species (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004). Microsatellites are considered to be an attractive tool for many applications such as tumor cells (*e.g.* Zienolddiny *et al.*, 2000; Maehara *et al.*, 2001), *in vitro* plant cell genetic instability (Lopes *et al.*, 2006) or metal/xenobiotics stresses (*e.g.* Paiva *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007a-c) and its popularity has increased in the last few years (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004).

Monteiro *et al.* (2007c) have used microsatellite DNA loci to evaluate mutagenic effects of Cd in lettuce (*Lactuca sativa*) plants. These authors have found Cd-induced physiological changes (such as chlorosis) but no microsatellite instability in roots and leaves of five-weeks old plants. When exposed chronically *Lactuca sativa* roots presented microsatellite instability at 10 μ M Cd (Monteiro *et al.*, 2007a).

During the last decade the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* has emerged as a plant of major interest and importance for phytoremediation and for fundamental studies on the mechanisms of extreme metal accumulation and sequestration (Schwartz *et al.*, 2006).

Some plants are able to accumulate extremely high levels of metals in its shoots without suffering phytotoxicity – hyperaccumulators. *Thlaspi caerulescens* is a member of the Brassicaceae family that is able to accumulate high levels of zinc (30 000 µg Zn/g) and cadmium (10 000 µg Cd/g), dry weight, in its shoots (Deniau *et al.*, 2006). Hyperaccumulation of cadmium is a rare phenomenon in higher plants (Zhao *et al.*, 2002) and the mechanism is not fully understood. The high polymorphism within *T. caerulescens* populations in relation to Cd accumulation suggests the existence of genetic differences (Basic *et al.*, 2006). This fact as well as its proximity to the genomic model *Arabidopsis*, increases the potential of *T. caerulescens* as a model species in metal toxicological studies. Moreover, this species potential in phytoremediation has been proposed together with other non-hyperaccumulator species (but with higher growth rates) (Khan, 2005).

The study of the mechanisms of metal homeostasis is receiving increasing attention because of technologies such as phytoremediation and phytomining and also because it may help improve the nutritional quality of plants and improve sustainable crop production (Assunção *et al.*, 2006), which are linked with human health.

In the last years the knowledge about the genes related or responsible for accumulation in these plants has increased though still a matter of uncertainty remains. Some genes involved in metal responses have been identified – TcHMA4, ZNT1, IRT1, Nramp3 (natural resistance-associated macrophage protein) (Papayan and Kochian, 2004; Pence *et al.*, 2000; Rubinelli *et al.*, 2002).

Martinez *et al.* (2006) have shown the potential of engineered plants for phytoremediation. These plants combined a higher biomass production with a superior capacity for pollutant accumulation and tolerance. Biotechnology seems to be the key for an ideal plant for environmental cleanup, making this way phytoextraction a viable commercial technology.

In order to understand the hyperaccumulation process of heavy metals (e.g. Cd) by plants, such as *T. caerulescens*, several aspects (e.g. physiology, genetics) much be studied. The physiology of metal hyperaccumulation has been intensively studied but the molecular genetics are still largely unexplored (Deniau *et al.*, 2006). Metals transport, accumulation, detoxification and tolerance involve complex mechanisms and the results obtained from new molecular techniques must be analyzed in a complementary way with the results revealed by more traditional methods.

In this study the following hypothesis were addressed:

- Cadmium exposure interferes differently with growth of *Thlaspi arvense* (non-accumulator) and *Thlaspi caerulescens* (hyperaccumulator) and is differently allocated in these species.
- Cadmium exposure may lead to genetic instability, in particular microsatellite instability, in both *Thlaspi* species.

Hence, the aim of this study was to test these hypotheses, namely to assess genetic instability, after exposure to cadmium, of two species of *Thlaspi*: the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-accumulator *Thlaspi arvense*.

Material and Methods

Plant material and growth conditions

Two species of the genus *Thlaspi*, the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae) – Ganges ecotype - (Saint-Félix-de-Pallières, Ganges, France) and the non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense* L. (Amsterdam) were placed in filter paper imbibed in distilled water in order to germinate. After germination plantlets were grown in hydroponic modified Rorison nutrient with the following basic composition, in mM: 1500 KNO₃, 1000 Ca(NO₃)₂·4H₂O, 500 NH₄H₂PO₄, 500 MgSO₄·7H₂O, 46.25 H₃BO₃, 0.77 ZnSO₄·7H₂O, 0.36 CuSO₄·5H₂O, 0.37 NaMoO₄·2H₂O, 10.12 MnCl₂·4H₂O, 17.91 FeCl₃. Solutions were continuously aerated and exchanged at intervals of 2 days in order to maintain a constant concentration of Cd and to avoid depletion of nutrients. Both distilled water and nutrient solution were supplemented with 0 and 10 µM Cd(NO₃)₂.

Plants were cultivated in a growth chamber at 25±2 °C with a photoperiod of 16h with a light intensity of 200 µmol /m²/s period) and a constant humidity (Figure 2.1).

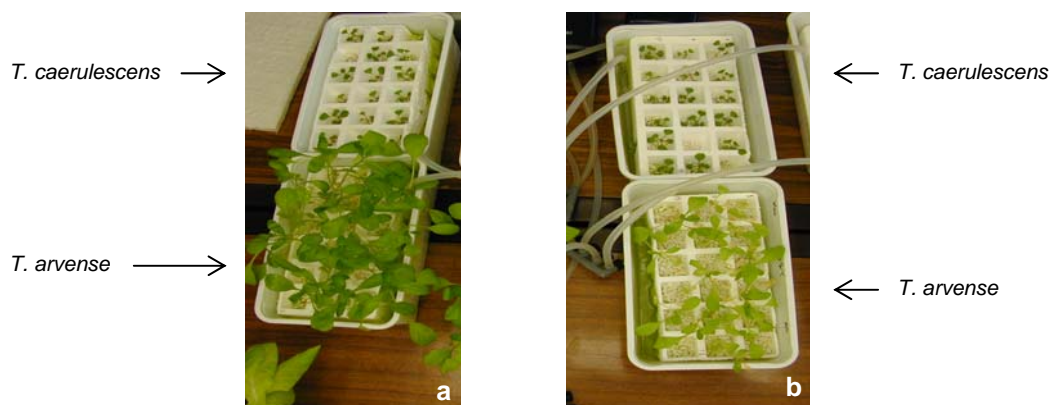


Figure 2.1 – a) Control plants of *Thlaspi arvense* and *Thlaspi caerulescens*; b) Cd-exposed plants of *Thlaspi arvense* and *Thlaspi caerulescens*

Root and shoot lengths were measured at day 6 (n=18) and at the end of exposure, at day 28 (n=15-17) when plants were harvested. Leaves and root samples were dried at 60°C for cadmium accumulation (n=3) (assessed by Inductively Coupled Plasma Spectroscopy – ICPS). Root samples were also stored at –80°C (immediately after collection) for posterior microsatellite analysis.

Cadmium analysis

In order to remove adsorbed Cd²⁺ ions, prior to drying, roots were washed in 0.5 mM CaSO₄ solution and deionised water for 10 min (Santos *et al.*, 2002). Root and leaf samples were dried at 60°C and were then treated according to Evans and Bucking (1976) and analyzed by ICPS for cadmium content determination. The same technique was used to determine Cd concentration in the hydroponic culture medium.

DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from about 80 mg of roots of control and Cd-exposed plants (n = 3) with the Dneasy[®] Plant Minikit (QIAGEN, Germany). Concentration and purity of the extracted DNA were estimated using 0.8 % agarose gel electrophoresis with ethidium bromide (EB) staining, comparing with a standard molecular weight marker (lambda *Hind* III, NEB, Great Britain).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

In order to assess genetic instability five primer sets were used to amplify five microsatellite loci selected from the literature.

The primers used in this work were developed by Basic and Besnard (2006) and synthesized by MWG-Biotech (Germany) (Table 2.1).

At the beginning six gene regions were selected based on the work of Basic and Besnard (2006) but the region Tc-WRKY gave ambiguous results (results not shown), therefore this marker was not included in this analysis. Two of the other five primers used were referent to genes considered to be putatively implicated in the heavy-metal hyperaccumulation and tolerance responses - ZNT5, IRT1 (Basic and Besnard, 2006, Table 2.1).

Table 2.1- General features of the 15 genomic DNA regions characterised for sequence polymorphism by Basic and Besnard (2006) and its identification as CAPS or SSR. Identification of microsatellites analysed in the present work (grey colour). Location of SSR (used) polymorphism and number (N) (adapted from Basic and Besnard (2006)).

Gene Code	Putative homologous gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> and encoded protein	CAPS / SSR	SSR location in the gene and repeated motif	N
Tc-ZNT1	At1g10970- Zn and Cd transporter	CAPS		
Tc-ZNT2	At1g60960- Putative Zn transporter	CAPS		
Tc-ZNT5	At1g05300- Putative Zn transporter	SSR	5'UTR-(CTT) ₄ CAT(CT) ₅	1
Tc-E2F1	At5g22220- E2F transcription factor-1	CAPS		
Tc-IRT1	At4g19690- Putative Fe(II) transporter-1	SSR	Intron-(AT) ₁₁	10
Tc-IRT2	At4g19680- Putative Fe(II) transporter-2	CAPS		
Tc-WRKY	At4g31550- WRKY transcription factor	SSR	Intron-(T) ₈ -(A) ₈	5
Tc-AGAMOUS	At4g18960- Floral homeotic protein AGAMOUS	SSR		2
Tc-CP	At1g30630-Putative coatomer protein	SSR	5'UTR-(GAA) ₇	5
Tc-up1	At2g47440- Unknown protein	SSR		
Tc-up2	At3g01860- Unknown protein	SSR		
Tc-up3	At1g16500- Unknown protein	SSR		
Tc-NOD	At4g30420- Nodulin-like protein	SSR	5'UTR-(TC) ₁₁	27
Tc-up4	At3g25410- Unknown protein	SSR		
Tc-bHLH	At5g04150- bHLH transcritpion factor	SSR	Intron-(TC) ₆	4

PCR conditions were identical to those described by Basic and Besnard (2006). For the amplification of each locus the following reaction mixture was made: 2 µl of sample obtained after genomic DNA extraction, reaction buffer (1x), 0.2 mM dNTP's, 0.2 µM of each oligonucleotide primer, 0.75 U of DNA polymerase and MgCl₂ according to the primer (Table 2.2), in a total volume of 25 µl.

Table 2.2 – Characteristics of microsatellite loci: GenBank accessions number, primer pairs used for PCR amplification, ABI dyes, and PCR conditions (annealing temperature (T_a) and $MgCl_2$ concentration), described in the original publication (Basic and Besnard, 2006).

GenBank accessions no.	Locus name	Primer (5' → 3')	T_a (°C)	$MgCl_2$ (mM)
AF292029	Tc-ZNT5	<i>f.</i> AATCACACAAAACGTTAAGCTC <i>r. Hex</i> – AAGGTATGGCGGCGATCTTG	53	1.5
AJ746208	Tc-IRT1	<i>f.</i> CTTGCGATATCGAGTCATTGC <i>r. Fam</i> – TCCAATGACCACAGAGTGAAC	53	1.5
AJ746244	Tc-CP	<i>f.</i> TTTGGAGTTAGACACGGATCTG <i>r. Hex</i> – GTTGATCGCAGCTTGATAAGC	53	1.5
AJ746215	Tc-NOD	<i>f.</i> AAGTACGTGTACGCCAACCG <i>r. Fam</i> – TGTA CTCTCTAACTTCCCC	53	5.5
AJ746217	Tc-bHLH	<i>f.</i> CTTGGAAACATTGGTGTTAAGG <i>r. Fam</i> – GATTCCATCTCAAATCCGGTC	53	1.5

Using a gradient Thermal Cycler (Thermo electron corporation) the reaction mixtures were incubated during 4 min at 94 °C followed by 36 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at annealing temperature (Table 2.2) and 1 min at 72 °C. The last cycle was followed by a 10 min extension at 72 °C, according to Basic and Besnard (2006).

PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gels, stained with EB and visualized on a UV transilluminator (Syngene G:Box), in order to check for amplification.

Fragments analysis

PCR product (1 µl) was mixed with 0.5 µl of GeneScan internal size standard labelled with ROX and 25 µl of formamide. Fragments were then analyzed by Capillary Electrophoresis (CE) on an ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). The results were automatically generated by the Genescan v. 3.7 software.

In order to test for reproducibility, some samples and procedures were repeated in different occasions (e.g. PCR amplifications and fragment analyses). The results of these duplicates showed that this protocol is highly reproducible for the species and conditions used.

Statistical analysis

For growth and cadmium accumulation statistical differences between control and 10 μM Cd-exposed plants were performed using *t*-tests. When normality and equality of variance were not achieved data were transformed (ln). When these criteria were not achieved even with transformed data, the non-parametric test of Mann-Whitney Rank Sum Test was performed. Sigma Stat (version 3.01, SPSS, Chicago, USA) was used to perform all statistical tests.

Results

In the nutrient solution of control plants Cd concentration was below the ICPS detection limit ($<0.01 \mu\text{M}$). In the nutrient solution with the nominal concentrations of $10 \mu\text{M}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ the effective concentration of Cd was $11.56 \mu\text{M}$.

Plants growth

Cadmium toxicity was assessed by measuring root and shoot growth. In *Thlaspi arvense* the differences in growth between Cd-exposed and control plants were visible but in the hyperaccumulator *T. caerulescens* this difference in growth was not verified (Figure 2.2).

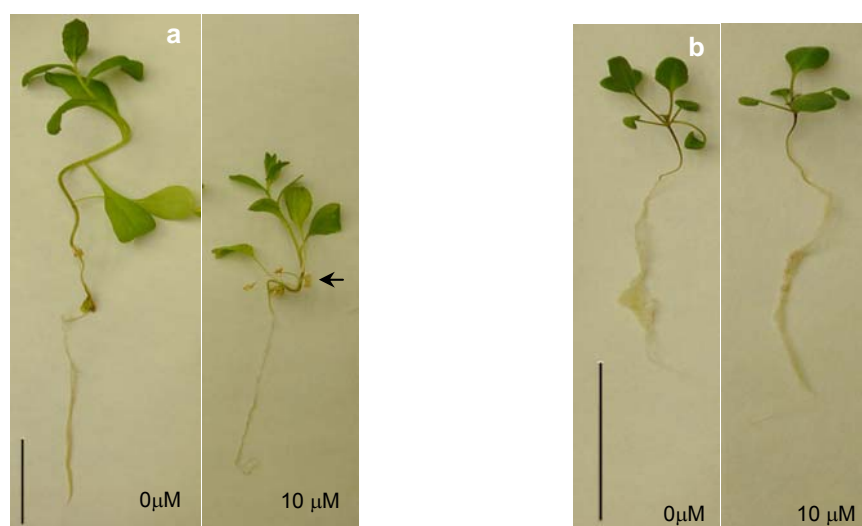


Figure 2.2 – a – *Thlaspi arvense*: control and Cd-exposed plants, respectively. Note in the Cd-exposed plant the lower growth, the general chlorosis and the necrotic elder leaves (arrow).
b – *Thlaspi caerulescens*: control and Cd-exposed plants, respectively. Plants of both species were harvested at the end of 28 days. (Bar: 5 cm)

Control plants of both species have grown without chlorosis or necrotic spots. In the non-accumulator *T. arvense*, Cd-exposed plants presented in general leaves with lighter-green (chlorosis) than control plants and elder leaves often became necrotic. Contrarily, *T. caerulescens* exposed plants showed no chlorosis or necrotic symptoms.

Shoots and roots were both measured when germinated plantlets were transferred to hydroponic modified Rorison nutrient solution (day 6) and at the end of the exposure (day 28). Results are shown in the next figure (Figure 2.3).

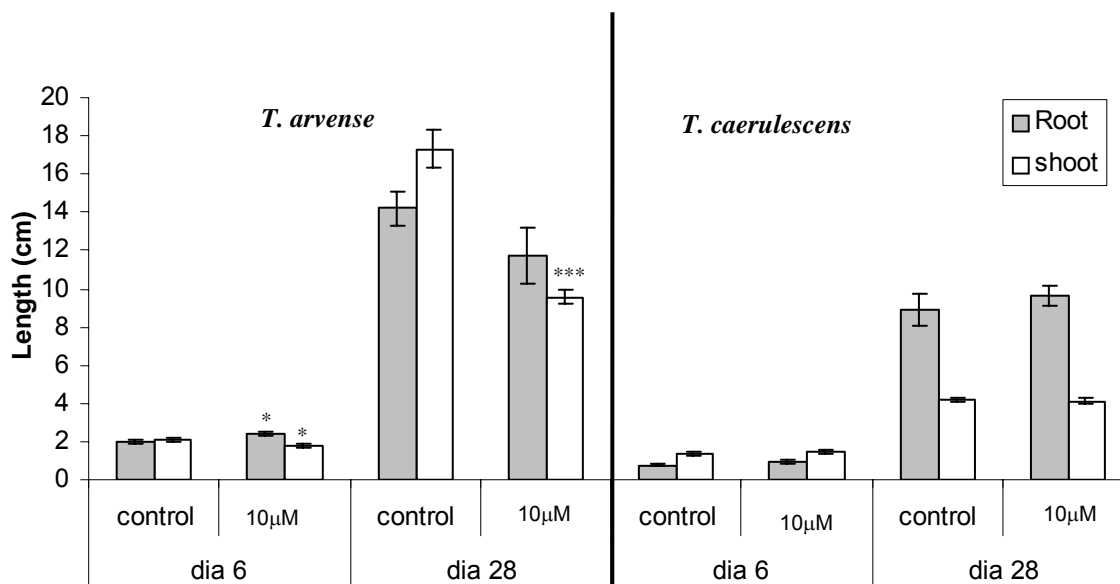


Figure 2.3 - Assessment of *T. arvense* and *T. caerulescens* root and shoot length (mean \pm SE) after 6 and 28 days of hydroponic culture in the presence and absence of cadmium. (*, *** - significantly different from control at the same day with $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

In the non-accumulator *T. arvense* the *t*-test showed that, at day 6, there was an increase of exposed roots length ($p = 0.013$) compared to the control ones (Fig. 2.2 and 2.3) while exposed shoots length decreased ($p = 0.021$ at day 6) (Fig. 2.2 and 2.3). At the end of the exposure period (day 28) only shoots showed significant decrease of length ($p < 0.001$) while exposed roots did not differ from control ones, in the limit ($p = 0.072$ by the non-parametric Mann-Whitney test).

In *T. caerulescens* the non-parametric test showed that, during the whole experiment, there were no significant differences in growth of roots in the presence/absence of Cd (with $p = 0.393$ at day 6 and $p = 0.368$ at the end of the exposure). In shoots the *t*-test also showed no significant differences in growth of shoots in the presence/absence of Cd ($p = 0.264$ and $p = 0.710$ at days 6 and 28 respectively).

Cadmium accumulation

Cadmium accumulation (dry weight - DW) was also analyzed in both species, by the end of the treatment. In *T. arvense* roots accumulated about 3.1-fold more Cd than leaves (Table 2.3). Also, in *T. arvense* Cd accumulation presented no significant differences in roots ($p=0.100$ by the non-parametric Mann-Whitney test). In leaves, there were significant differences in cadmium accumulation at the end of exposure (t -test, $p=0.013$).

Table 2.3 – Accumulation of cadmium in roots and leaves of *Thlaspi arvense* and *Thlaspi caerulescens* at the end of the exposure (day 28).

	Cadmium accumulation ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DW)			
	<i>Thlaspi arvense</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
	Control	10 μM	Control	10 μM
Roots	0.000 \pm 0.0000	0.536 \pm 0.0843	0.066 \pm 0.0155	0.222 ^a
Leaves	0.014 \pm 0.0111	0.174 \pm 0.0221 *	0.051 \pm 0.0175	0.762 \pm 0.0651 ***

^a Statistical analysis not possible in roots due to the loss of two samples during the treatment.

*, *** significantly different from control with $p<0.05$ and $p<0.001$, respectively.

In *T. caerulescens* statistical analysis presented differences in leaves ($p<0.001$ by t -test) (Table 2.3). In this species Cd accumulation was about 3.4-fold higher in leaves than in roots.

Roots of *T. arvense* showed a higher Cd accumulation than roots of *T. caerulescens* (the hyperaccumulator) (about 2.4-fold), while leaves of *T. caerulescens* accumulated about 4.4-fold more Cd than leaves of *T. arvense*. In *T. arvense* Cd accumulates preferentially in roots and in the hyperaccumulator *T. caerulescens* Cd accumulates preferentially in leaves. Leaves of *T. caerulescens* accumulate about 1.4-fold more Cd than roots of *T. arvense*.

Microsatellite instability

After evaluating the integrity of genomic DNA extracted from roots of both *T. arvense* and *T. caerulea* (Figure 2.4) the Polymerase Chain Reaction (PCR) has occurred successfully under the conditions previously indicated.



Figure 2.4 – Agarose gel electrophoresis with EB staining showing genomic DNA (samples 1 to 4). (L) corresponds to the DNA ladder.

PCR products were electrophoresed in an agarose gel in order to check for amplification (Figure 2.5) and then microsatellite loci were analyzed in a capillary electrophoresis system for microsatellite analysis.



Figure 2.5 — Agarose gel electrophoresis with EB staining showing SSR's (1 to 8). (L) corresponds to the DNA ladder; samples 1, 2 and 3 correspond to SSR (17, 18); samples 4, 5 and 6 corresponds to SSR (11,12); and sample 7 and 8 corresponds to SSR (9,10).

Results are summarized in Table 2.4 and can be compared with results obtained in previous studies (Table 2.5).

For each species, allele size was identical both in the presence and in the absence of cadmium (control) (Figure 2.6 and 2.7). No microsatellite instability was found on the samples in study.

Table 2.4 - SSR locus used in this work and the correspondent allele sizes obtained for control and Cd-exposed plants of *T. arvense* (grey colour) and *T. caerulescens*.

Locus name	SSR	Allele size (pb) <i>T. arvense</i> Control	Allele size (pb) <i>T. arvense</i> Cd-exposed plants	Allele size (pb) <i>T.caerulescens</i> Control	Allele size (pb) <i>T.caerulescens</i> Cd-exposed plants
Tc-ZNT5	(9,10)	153/155	153/155	153/155	153/155
Tc-IRT1	(11,12)	142	142	170	170
Tc-CP	(15,16)	143	143	159/161	159/161
Tc-NOD	(17,18)	206/208	206/208	246	246
Tc-bHLH	(19,20)	146	146	143	143

Table 2.5 - SSR loci used in this work and the correspondent allele sizes obtained (grey color) for both species and the allele size obtained in other study and described by Basic and Besnard (2006).

Locus name	Allele size Found in this work (pb) Ta	Allele size (pb) (Basic and Besnard, 2006) <i>Thlaspi arvense</i>	Allele size Found in this work (pb) Tc	Allele size (pb) (Basic and Besnard, 2006) <i>Thlaspi caerulescens</i>
Tc-ZNT5	153/155	157	153/155	157
Tc-IRT1	142	166	170	173-195
Tc-CP	143	145	159/161	151-164
Tc-NOD	206/208	209-213	246	216-312
Tc-bHLH	146	149	143	144-150

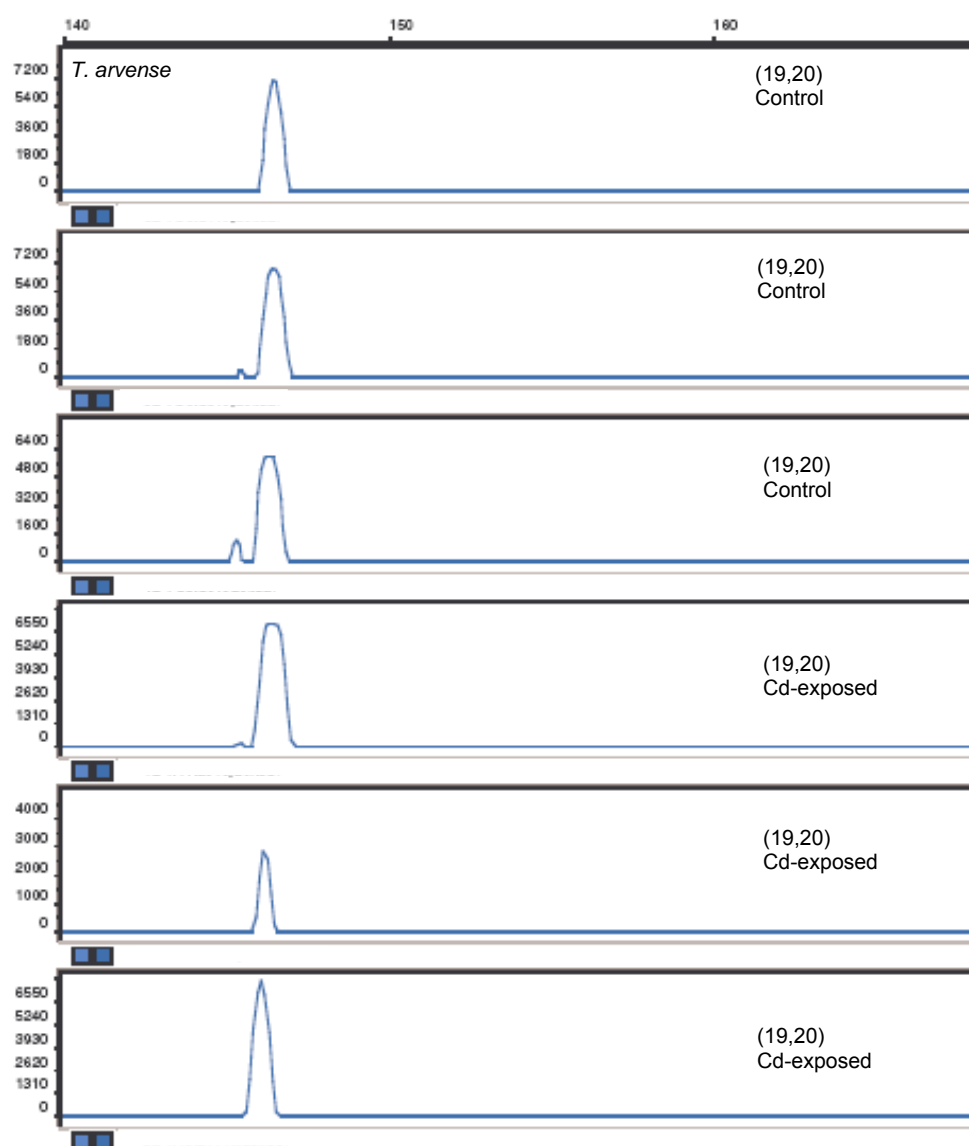


Figure 2.6 – Electropherograms correspondent to *Thlaspi arvense*: SSR (19,20). The ABI Dye used was FAM. The electropherograms correspond to control and Cd-exposed plants (10 μ M Cd(NO₃)₂) harvested for roots. Top scale indicates fragment size (bp) and left scale indicates the fluorescence intensity.

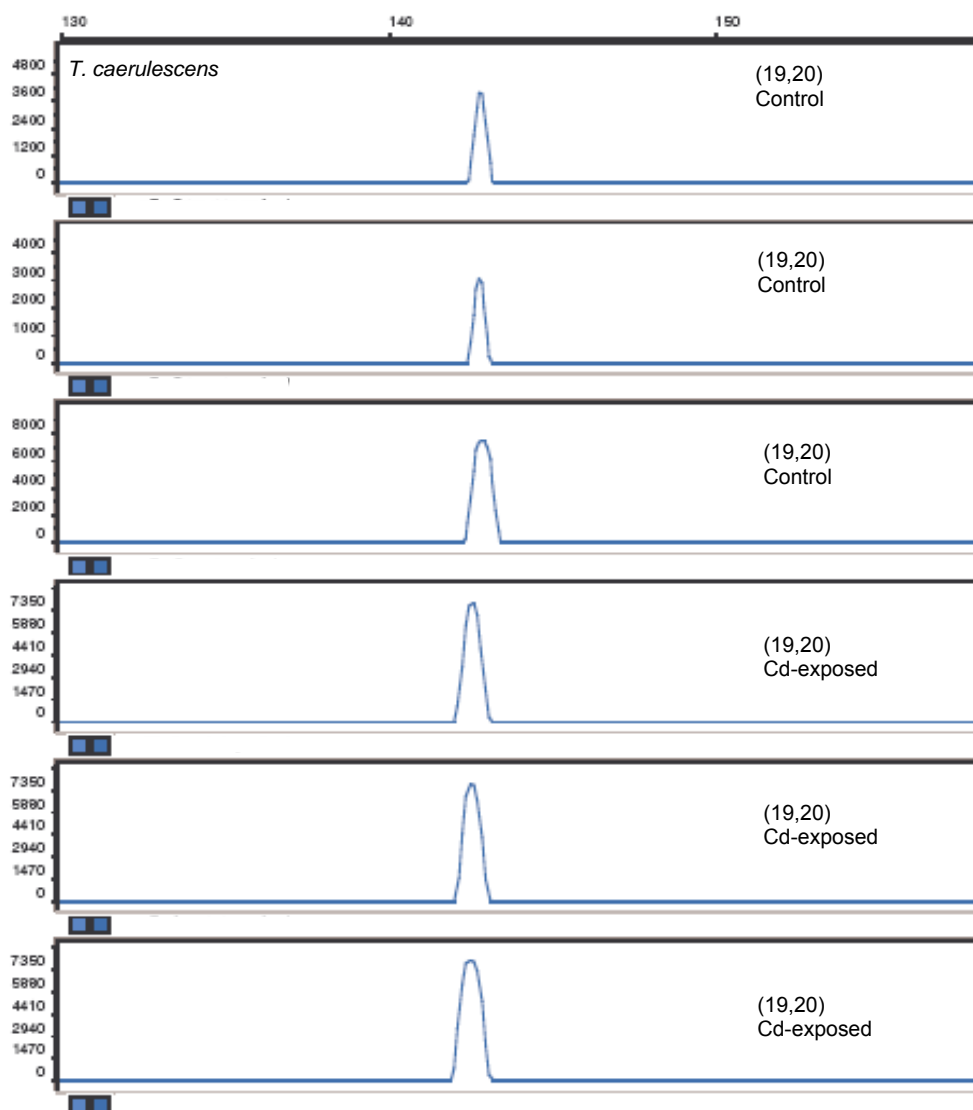


Figure 2.7 - Electropherograms correspondent to *Thlaspi caerulescens*: SSR (19,20). The ABI Dye used was FAM. The electropherograms correspond to control and Cd-exposed plants (10 μ M Cd(NO₃)₂) harvested for roots. Top scale indicates fragment size (bp) and left scale the fluorescence intensity.

Genotoxic effects were not detected with this method in the specific concentrations and conditions studied in the two species tested.

Discussion

Due to the unspecific responses to stress conditions, in order to find a more specific response to cadmium it is very important to control as much variables as possible to which the plant is submitted.

Although field studies are closest to real conditions, in laboratory the variables to which plants are submitted are better controlled. It is also important to determine the moment of contact with the metal. In the present study the contact was since germination until the moment plants were harvested. In this way, seed coat presents the first barrier for cadmium absorption by germinating seeds (Seregin and Ivanov, 2001). Another aspect is that plants were chronically exposed to cadmium, more closed to the situations occurring in the field.

Plants were grown in hydroponic conditions since in this way the metal pool accessibility to the plant is more controlled than in the complex environment of the soil.

Soil solutions having a Cd concentration from 0.32 to about 1 μ M are considered as polluted to a moderate level (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). Some authors used higher concentrations of cadmium but for a short period (e.g. Suzuki, 2005; Ünyayar *et al.*, 2006). In soil solutions containing Cd concentrations as high as 35 μ M, Cd-hyperaccumulating species are the only ones that can grow (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999).

In this work cadmium-exposed plants of *T. arvense* present generalised chlorosis and elder leaves often became necrotic. Previous studies have shown that *T. arvense* can survive in the presence of 100 μ M Cd but the material obtained would not be enough for the aim of this study – microsatellite analysis (Monteiro, 2008 – pers. comm.).

Monteiro *et al.* (2007a) have showed that *Lactuca sativa* roots exposed to 10 μ M Cd presented microsatellite instability.

Wójcik *et al.* (2005) referred that roots were more sensitive to cadmium toxicity than shoots. Statistical analysis of length values show that in *T. arvense* (non-accumulator) only in roots and at day 28 there are no significant differences between plants exposed to cadmium and control. Nevertheless, when comparing the statistical value it is possible to see that even in this case the p value is near the limit of significance values. Furthermore,

under abiotic stress conditions, sensitive plants often develop long and very thin roots (Santos, C 2008, pers. comm.). For *Thlaspi caerulescens*, it was evident that cadmium exposure did not affect the length of both roots and shoots.

Previous studies, with non-accumulator species, concluded that root biomass is more sensitive to Cd than shoot biomass, since roots are the first site of exposure and toxicity (Misrha *et al.*, 2006).

Enhanced translocation from the absorbed metal to the shoot is thought to be an important trait in hyperaccumulation (Pence *et al.*, 2000). This could explain the greater cadmium accumulation in the shoots of *T. caerulescens* rather than in the roots (per mg DW). Contrarily, it is possible to see that in the non-accumulator, *T. arvense*, Cd accumulation per mg, of DW is greater in roots than in shoots. Finally, it can also be observed that roots of *T. arvense* accumulate more Cd than the ones of the hyperaccumulator species.

In this study five microsatellites were used as molecular markers in order to assess genetic instability due to Cd exposure. The uniform microsatellite patterns found for the microsatellites evaluated suggest that the Cd treatment performed generated no genetic instability on both *T. arvense* and *T. caerulescens* roots.

The DNA repair processes of the plant could have lead to the absence of MSI even in roots of the non-accumulator *Thlaspi arvense*.

Although Cd toxicity is well documented (e.g. Ünyayar *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007a) plants basic metal tolerance is ubiquitous and transport, chelation and sequestration are the main components of metal homeostasis (Clemens, 2006). In response to metals plants may reduce metal uptake and take metals into cell compartments that are metabolically inactive (Seregin and Ivanov, 2001). In the presence of Cd the plant responds in order to maintain cell homeostasis. Many of these responses are unspecific, being activated when the plants are exposed to various stress conditions (e.g. salinity, high or low temperature). Activation of stress enzymes – catalase, peroxidase, superoxide dismutase, super production of osmolytes due to metal-induced moisture stress, changes in the physical-chemical properties of the cell walls, synthesis of polyamines, changes in hormonal balance and synthesis of metal-binding compounds and stress proteins are some of these protective mechanisms that are activated due to stress conditions that enable plant survival (Seregin and Ivanov, 2001).

It has been speculated that due to “genetic erosion” often present in contaminated areas, or in other words due to directional selection pressure, several species have developed the capacity to hypertolerate or even hyperaccumulate metals (Van Straalen and Martijn, 2002). The mechanisms responsible for the extraordinary capacity to hyperaccumulate metals of some species are not, however, fully understood.

Some studies have shown that the hyperaccumulator presents a delay in transmembrane uptake, which may represent an important defensive strategy against Cd poisoning, allowing time for activation of intracellular mechanisms for heavy metal detoxification (Nedelkoska and Doran, 2000). It would be interesting to assess the kinetics of Cd accumulation/patterning in both species, in order to confirm a putative delay of *T. caerulea* to accumulate Cd in the first days, and complement the data for 28 days.

In general, the content of Cd is greater in the roots, having however a considerable expression in leaves. The content of Cd is greater in young or in senescing leaves depending on the species. In *T. caerulea* the content of Cd is usually greater in young leaves (Seregin and Ivanov, 2001). Kupper *et al.* (2004) have demonstrated that ligands depended on the metal and the function and age of plant tissue. It seems that plants prefer to detoxify hyperaccumulated metals by pumping them into vacuoles rather than to synthesize metal specific ligand (e.g. Kupper *et al.*, 2004).

SSR marker analysis has already been used successfully, in *Lactuca sativa*, for an assessment of chemical genotoxicity (Monteiro *et al.*, 2007a; Monteiro *et al.*, 2007c).

In genotoxicity studies a battery of traditional and molecular methods should be used in a complementary way, instead of a unique method.

Monteiro *et al.* (2007b), using flow cytometry (this technique is able to detect ploidy differences, cell cycle changes and chromosome aberrations), obtained similar results for the same species of *Thlaspi* and for identical study conditions, detecting no major ploidy changes.

According to the results obtained in the present study and in the study above mentioned it seems that Cd induced toxicity in *Thlaspi arvense* (observed by some necrosis occurrence in expanded leaves and by general chlorosis as well as length rate reduction) but no genetic instability. In *Thlaspi caerulea* it seems that for the conditions of the present study (and besides the high accumulation of Cd in shoots of Cd-exposed plants) the hyperaccumulator presents no toxicological symptom detectable by the evaluation realized during this study.

Several authors have shown that Cd induces DNA mutation or damage in plants. By using comet assays to assess DNA damage in Cd-treated tobacco plants, Gichner *et al.* (2004) found that Cd induced damages only in roots, supporting these data by the fact that roots accumulated much higher levels of Cd than the aboveground parts. Another study, with potato plants, using also the comet assay, showed that after short-term treatments (24h) with Cd, roots present DNA damage contrarily to leaves only after 2 weeks of Cd-exposure presents genotoxicity (Gichner *et al.*, 2008). These authors suggest that the absence of Cd-genotoxicity in leaves after short-term treatments may be explained, once more, by the fact that roots accumulated much higher levels of Cd than the aboveground parts.

In some species like *Hordeum vulgare* relatively low concentrations of cadmium (10^{-3} – 10^{-5} M) induced genotoxic effects namely chromosomal aberrations and micronuclei formation (Zhang and Xiao, 1998). The same authors have shown the antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against genotoxic effects in root cells of the same species.

The analysis of the results obtained with comet assay in *Vicia faba* has showed that Cd induced a significant increase in DNA migration in root cells (Koppen and Verschaeve, 1996).

The mechanisms responsible for Cd toxicity (in particular genotoxicity) are not fully understood, yet. Studies with *Vicia faba* plants have shown that an important mechanism of cadmium phytotoxicity was oxidative stress induced by Cd accumulation (Lin *et al.*, 2007).

Other assays like micronucleous (MCN) and single cell gel electrophoresis assay (comet assay) were suggested as valuable tool for monitoring DNA damage in plants systems (Koppen and Verschaeve, 1996) and should be used to complement the genotoxicological assessment of Cd, and of metals in general.

The knowledge of DNA markers and the genetic study of species help scientific community to better understand phenotypic responses not yet explained. Furthermore, these molecular/genetic tools may help to identify and characterize mutants with applied or fundamental interest.

Finally, it is for sure necessary further studies of physiological, biochemical and molecular mechanisms, to better understand the mechanisms of cadmium hyperaccumulation in some plants, in order to make phytoextraction a cost-effective mean to cleanup soils from this extremely toxic heavy metal.

Acknowledgments

FCT supported the doctoral fellowship of M. Monteiro (FCT/SFRH/BD/17491/2004), and the postdoctoral fellowship of T. Lopes (FCT/SFRH/BPD/6012/2001). We thank L. Souto and H. Moreira for technical assistance.

References

- ❑ ASSUNÇÃO, Ana G. L.; PIEPER, Bjorn; VROMANS, Jaap; LINDHOUT, Pim; AARTS, MARK G. M.; SCHAT, Henk. Construction of a genetic linkage map of *Thlaspi caerulescens* and quantitative trit loci analysis of zinc accumulation. **New Phytologist**, 170, (2006), pp. 21-32.
- ❑ AZEVEDO, H; GOMES, Clara; PINTO, Glória; SANTOS, Conceição. Cadmium effects in sunflower: membrane degradation and oxidative stress enzyme activity in leaves and calluses. **J. Plant Nutrition**, 28(12), (2005), pp. 2221-2231.
- ❑ AZEVEDO, Helena; GOMES, Clara; PINTO, Glória; SANTOS, Conceição. Cadmium effects in sunflower: nutrient imbalances in leaves and calluses. **J. Plant Nutrition**, 28(12), (2005), pp. 2233-2241.
- ❑ AZEVEDO, Helena; GOMES, Clara; PINTO, Glória; LOUREIRO, Susana; SANTOS, Conceição. Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis. **J Plant Nutrition**, 28(12), (2005), pp. 2211-2220.
- ❑ BASIC, N. and BESNARD, G.. Gene polymorphisms for elucidating the genetic structure of the heavy-metal hyperaccumulating trait in *Thlaspi caerulescens* and their cross-genera amplification in Brassicaceae. **J. Plant Res.**, 119, (2006), pp. 479-487.
- ❑ BASIC, Nevena; SALAMIN, Nicolas; KELLER, Catherine; GALLAND, Nicole and BESNARD, Guillaume. Cadmium hyperaccumulation and genetic differentiation of *Thlaspi caerulescens* populations. **Biochemical Systematics and Ecology**, 34, (2006), pp. 667-677.
- ❑ CLEMENS, S..Toxic metal accumulation, responses to expodure and mechanisms of tolerance in plants. **Science Direct – Biochimie**, 88, (2006), pp. 1707-1719.
- ❑ DENIAU, A. X.; PIEPER, B.; BOOKUM, W. M. Ten; LINDHOUT, P.; AARTS, M.G. M.; SCHAT, H.. QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Theor Appl Genet**, 113, (2006), pp. 907-920.
- ❑ EVANS, F.; BUCKING, W.. Mineral analysis. In Nitsche, J.P. (Ed.), Modern methods in forest genetics. **Springer-Verlag**, Berlin (1976), pp. 165-188.
- ❑ FILIPIC, M; FATUR, T; VUDRAG,M.. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. **Human & Experimental Toxicology**, 25, (2006), pp. 67-77.

- FILIPIC, Metka and HEI, Tom K.. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, 546, (2004), pp. 81-91.
- GICHNER, Tomás; PATKOVA, Z.; SZAKOVA, J.; ZNIDAR, DEMMEROVÁ, K.. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutation or homologous recombination in tobacco leaves. **Mutation Research / Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis**, vol. 559, issues 1-2, (11 April 2004), pp. 49-57.
- GICHNER, T; PATKOVA, Z; SZAKOVA, J; ZNIDAR, I; MUKHERJEE, A.. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and gamma-rays. **Environmental and Experimental Botany**, 62 (2), (Mar 2008), pp. 113-119.
- GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C. and RAMESH, B.. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers (Review article). **Current science**, vol. 70, n.º1, (January 1996).
- HINKLE, Patricia M.; KISELLA, Patricia A. and OSTERHOUDT, Kevin C.. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, n.º 34, (1987), pp. 16333-16337.
- JIANG, R. F.; MA, D. Y.; ZHAO, F. J. and McGRATH, S. P..Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). **New Phytologist**, 167, (2005), pp. 805-814.
- JIN, Yong Hwan; CLARK, Alan B.; SLEBOS, Robbert J. C.; AL-REFAI, Hanan; TAYLOR, Jack A.; KUNKEL, THOMAS A.; RESNICK, Michael A. and GORDENIN, Dmitry A.. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. **Nature Genetics**, vol. 34, n.º3, (July 2003).
- KHAN, Abdul G..Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 18, (2005), pp. 355-364.
- KOPPEN, G; VERSCHAEVE, L.. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutat. Res.**, vol. 369 (3), (Aug 1996), pp. 193-200.
- KUPPER, Hendrik; MIJOVILOVICH, Ana; MEYER-KLAUCKE, Wolfram and KRONECK, Peter M. H.. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by xray absorption spectroscopy. **Plant Physiol**, 134 (2), (2004), pp. 748-757.

-
- ❑ LASAT, M. M.. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/ soil/ metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazourds Substance Research**, vol. 2, (2000).
 - ❑ LIN, Ai-jun; ZHANG, Xu-hong; CHEN, Mei-mei and CAO, Qing. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. **Journal of Environmental Sciences**, vol. 19, issue 5, (2007), pp. 596-602.
 - ❑ LOPES, Tina; PINTO, Glória; LOUREIRO, João; COSTA, Armando; SANTOS, Conceição. Determination of genetic stability in cork oak long term somatic embryogenic cultures and derived plants using microsatellite markers. **Tree Physiology**, 26, (2006), pp. 1145–1152.
 - ❑ MAEHARA, Yoshihiko; ODA, Shinya; SUGIMACHI, Keizo. The instability within:problems in current analyses of microsatellite instability (mini review). **Mutation Research**, 461, (2001), pp. 246-263.
 - ❑ MARTINEZ, Mar; BERNAL, Pilar; ALMELA, Concepcion; VÉLEZ Dinoraz;, GARCIA-AGUSTIN, Pilar; SERRANO Ramón; NAVARRO-AVIÑÓ, Juan. An engineered plant that accumulates higher levels higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. **Chemosphere**, 64, (2006), pp. 47-485.
 - ❑ MISHRA, S.; SRIVASTAVA S.; TRIPATHI R. D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAHOSE S. V.; PRASAD, M. N. V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant physiology and Biochemistry**, 44, (2006), pp. 25-37.
 - ❑ MONTEIRO, M.; PAIVA, C.; SOARES, A.M.V.M.; MANN, R.M.; SANTOS, C. and LOPES, T.. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. **Setac**, Porto, Portugal, (20-24 May 2007). a)
 - ❑ MONTEIRO, M.; RODRIGUEZ, E.; LOUREIRO, J.; SOARES, A.M.V.M.; MANN, R.M.; SANTOS, C. and LOPES, T.. Assessment of ploidy stability by flow cytometry in plants chronic exposed to cadmium. **Setac**, Porto, Portugal, (20-24 May 2007). b)
 - ❑ MONTEIRO, M.; SANTOS, C; MANN, R.M.; SOARES, A.M.V.M. and LOPES, T.. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. Using nuclear microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**, 60 (3), (2007), pp. 421-427. c)

- ❑ NEDELKOSKA, Tatjana V.; DORAN, Pauline M.. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. **Biotechnology and bioengineering**, vol. 67, n.º 5, (March 5, 2000).
- ❑ PAIVA, C.; MONTEIRO, Marta; SANTOS, Conceição; LOPES, Tina. Evaluation of microsatellite instability (MSI) in *Lactuca sativa* exposed to cadmium. **Congresso de Bioquímica**, Universidade de Aveiro, Portugal, (2006).
- ❑ PAPOYAN, Ashot and KOCHIAN, Leon V.. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transport ATPase. **Plant Physiology**, vol. 136, (Novembro 2004), pp.3814-3823.
- ❑ PENCE, Nicole S.; EBBS, Stephen D. ; LETHAM, Deborah L. D.; LASAT, Mitch M.; GARVIN, David F.; EIDE, David; KOCHIAN, Leon V.. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn / Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **PNAS**, vol. 97, n.º 9, (April 2000), pp. 4956-4960.
- ❑ RAKOCZY-TROJANOWSKA, Monika; BOLIBOK, Hanna. Characteristics of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, vol. 9, (2004), pp. 221-230.
- ❑ RUBINELLI, Peter; SIRIPORNADUSIL, Surasak; GAO-RUBINELLI, Fei; SAYRE, Richard. Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation. **Planta**, 215, (2002), pp. 1-13.
- ❑ SANITÀ DI TOPPI, L. and GABRIELLI, R.. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 41, (1999), pp. 105-130.
- ❑ SANTOS, CV; FALCÃO, IP; PINTO, GC; OLIVEIRA, H; LOUREIRO, J. Nutrient responses and glutamate and proline metabolism in sunflower plants and calli under Na₂SO₄ stress. **J Plant Nutr Soil Sci.**, 165, (2002), pp. 366-372.
- ❑ SCHWARTZ, Christophe; SIRGUEY, Catherine; PERONNY, Sylvie; REEVES, Roger D.; BOURGAUD, Frédéric; MOREL, Jean Louis. Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. **International Journal of Phytoremediation**, 8, (2006), pp. 339-357.
- ❑ SEREGIN, I. V. and IVANOV, V. B.. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, vol. 48, n.º4, (2001), pp. 606-630.
- ❑ SUZUKI, Nobuaki. Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis seedlings*. **Plant Biotechnology**, 22 (1), (2005), pp. 19-25.

-
- ❑ ÜNYAYAR, Serpil; ÇELİK, Ayla; ÇEKİÇ F. Özlem, GÖZEL, Aysin. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, vol. 21, n.º1, (2006), pp. 77-81.
 - ❑ VAN STRAALLEN, Nico; MARTIJN, Timmermans. Genetic variation in Toxicant-stressed populations: An evolution of the “Genetic Erosion” hypothesis. **Human and ecological risk assessment**, vol. 8, number 5 (20), (2002), pp. 983-1002.
 - ❑ WÓJCIK, Malgorzata; VANGRONSVELD, Jaco; TUKIENDORF, Anna. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*.I Growth parameters, metal accumulation and Phytochelatin synthesis in response to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, 53, (2005), pp. 151-161.
 - ❑ ZHANG, Yixian; XIAO, Hong. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. **Mutation research**, 420, (1998), pp. 1-6.
 - ❑ ZHAO, Fang-Jie; HAMON, Rebecca E.; LOMBI, Enzo; McLAUGHLIN, Mike J. and McGRTH, Steve P..Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, vol. 53, n.º 368, (March, 2002), pp. 535-543.
 - ❑ ZIENOLDDINY, Shanbeh; SVENDSRUD, Debbie, H.; RYBERG, David; MIKALSEN, Aase B.; HAUGEN, Aage. Nickel (II) induces microsatellite mutations in human lung cancer cell lines. **Mutation Research**, 452, (2000), pp. 91-100.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS/PERSPECTIVAS

FUTURAS

CONSIDERAÇÕES FINAIS/PERSPECTIVAS FUTURAS

A hiperacumulação de metais em plantas é uma área (da toxicologia vegetal/ambiental) que tem vindo a merecer a atenção de muitos investigadores, sobretudo na última década, nomeadamente pelo interesse aplicado na fitorremediação e pelo facto do conhecimento dos mecanismos de hiperacumulação de metais pelas plantas hiperacumuladoras ser ainda escasso. Para além disso, o interesse e necessidade crescente do reaproveitamento de solos agrícolas e o reconhecimento da perigosidade de substâncias, como o cádmio, para a saúde pública têm levado a uma aposta nesta área de estudo e a um aumento do conhecimento.

Quando submetidas a condições de stress (e.g. presença de contaminantes) as plantas respondem muitas vezes de forma inespecífica, activando vários mecanismos que permitem adaptações às novas condições e a sua sobrevivência. A compreensão destes mecanismos é normalmente difícil, *in situ*, dada a complexidade de factores envolvidos, pelo que ensaios controlados em laboratório podem auxiliar na compreensão desses mecanismos. Este facto esteve subjacente na opção de realizar os ensaios de toxicidade do Cd em laboratório (e.g. utilização de cultura hidropónica, exposição crónica). Para além disso, a escolha de uma só concentração de cádmio assentou em trabalhos anteriores, e a selecção das duas espécies deveu-se à classificação distinta destas perante o metal pesado em causa (uma é não acumuladora e outra hiperacumuladora).

Neste primeiro rastreio, apenas se seleccionou a raiz para avaliação de instabilidade de microssatélites, em detrimento das folhas, dado que é não só a primeira barreira à entrada de Cd na planta, mas também a principal porta de entrada. Algumas plantas acumuladoras permitem a entrada de Cd através da raiz havendo posterior translocação para as folhas. Assim, em estudos posteriores e considerando os valores de acumulação de Cd, será interessante analisar também as folhas.

Considerando as questões colocadas na fase inicial do presente trabalho encontraram-se as seguintes respostas:

- 1) O crescimento de *Thlaspi arvense* é afectado pela exposição a cádmio quer na avaliação efectuada no dia 6 da exposição (no caso da raiz e folha) quer no dia

28, no caso da folha. Para esta espécie apenas a curto prazo o crescimento da raiz é afectado. Contrariamente, a espécie hiperacumuladora (*T. caerulescens*) não tem o crescimento afectado pela concentração de Cd em estudo.

- 2) As plantas de *T. arvense* apresentando maior clorose e necrose, apontam para uma maior sensibilidade desta espécie face à hiperacumuladora.
- 3) Em geral a espécie hiperacumuladora acumula mais cádmio nas folhas face à raiz, enquanto a não acumuladora acumula preferencialmente na raiz.
- 4) Nas condições de estudo e para os microssatélites analisados não foi detectada instabilidade genética nem na espécie não acumuladora nem na espécie hiperacumuladora. Não se exclui que exposições de maior duração e/ou a concentrações mais elevadas levem a alterações.

Do mesmo modo que na avaliação do risco ecotoxicológico a análise multidisciplinar é essencial também na avaliação do risco genotoxicológico é desejável o cruzamento de várias técnicas para avaliação nomeadamente da existência em maior ou menor extensão ou mesmo da inexistência de danos no DNA. As técnicas tradicionais devem ser usadas de forma complementar à avaliação molecular.

Futuramente, e de modo a complementar os resultados obtidos a utilização de técnicas como ensaio cometa e micronúcleos permitirá verificar a existência ou não de danos no DNA ao nível da célula ou mais especificamente ao nível do cromossoma.

A análise comparativa dos ecotipos Prayon (pequena capacidade hiperacumuladora) e Ganges (grande capacidade hiperacumuladora) da *T. caerulescens* em termos de instabilidade de microssatélites seria uma mais-valia (para além da diferente capacidade hiperacumuladora estes ecotipos terão possivelmente mecanismos de absorção também diferentes).

A exposição a concentrações mais elevadas seria interessante de modo a perceber se a planta é afectada numa exposição crónica, como a deste estudo, a concentrações extremas.

Em termos práticos, a busca do conhecimento dos mecanismos de acção bem como dos genes responsáveis pela capacidade hiperacumuladora permite através da biotecnologia a incorporação destes genes em plantas com maior biomassa e crescimento mais rápido tornando economicamente viável a prática de fitorremediação, uma técnica promissora na recuperação de solos contaminados nomeadamente com cádmio.

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO CÁDMIO EM DUAS ESPÉCIES DE *THLASPI*

Aluna: Catarina Isabel Curralo de Paiva

Orientadora: Prof. Doutora Conceição Santos

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO CÁDMIO EM DUAS ESPÉCIES DE *THLASPI*

- Introdução
- Materiais e métodos
- Resultados/Discussão
- Perspectivas Futuras
- Referências Bibliográficas
- Agradecimentos

Introdução

Cádmio

- Extremamente tóxico (para o ambiente e população)** (OSHA)
- Potencial citotóxico, mutagénico** (animais e plantas) **e carcinogénico** (animais)
- Relativa mobilidade** (Benavides *et al.*, 2005) **/biodisponibilidade** (Clemens, 2006) (plantas)
- Tempo de meia vida biológico longo** (\pm 30 anos) (Filipic *et al.*, 2006)

Homem:

Principal fonte Cd: dieta;

Exposição aguda – afecta pulmões, tracto gastrointestinal, ossos, ovários, testículos;

Exposição crónica: doença óssea deformante

Introdução

Cádmio

- Extremamente tóxico (para o ambiente e população)** (OSHA)
- Potencial citotóxico, mutagénico** (animais e plantas) **e carcinogénico** (animais)
- Relativa mobilidade** (Benavides *et al.*, 2005) **/biodisponibilidade** (Clemens, 2006) (plantas)
- Tempo de meia vida biológico longo** (\pm 30 anos) (Filipic *et al.*, 2006)

Plantas (Sanità di Toppi and Gabrielli, 1999):

- Clorose das folhas e Inibição do crescimento da planta;**
- Inibição da abertura dos estomas;**
- Afecta o metabolismo do azoto, a respiração;**
- Reduz a absorção de nutrientes pela planta;**
- Indução e/ou inibição de enzimas;**
- Alteração do equilíbrio hídrico, e do fluxo de catiões;**
- Produção de radicais livres** [e.g. espécies reactivas de oxigénio (ROS)].

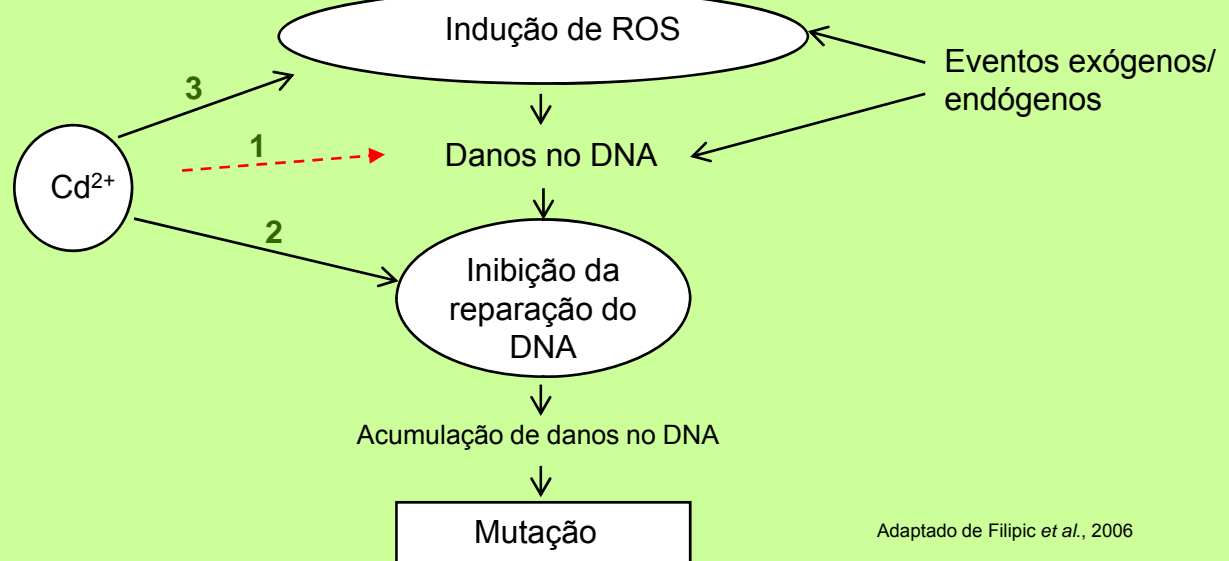
Introdução

Cádmio

- Extremamente tóxico (para o ambiente e população) (OSHA)
- Potencial citotóxico, mutagénico (animais e plantas) e carcinogénico (animais)
- Relativa mobilidade (Benavides *et al.*, 2005) /biodisponibilidade (Clemens, 2006) (plantas)
- Tempo de meia vida biológico longo (± 30 anos) (Filipic *et al.*, 2006)

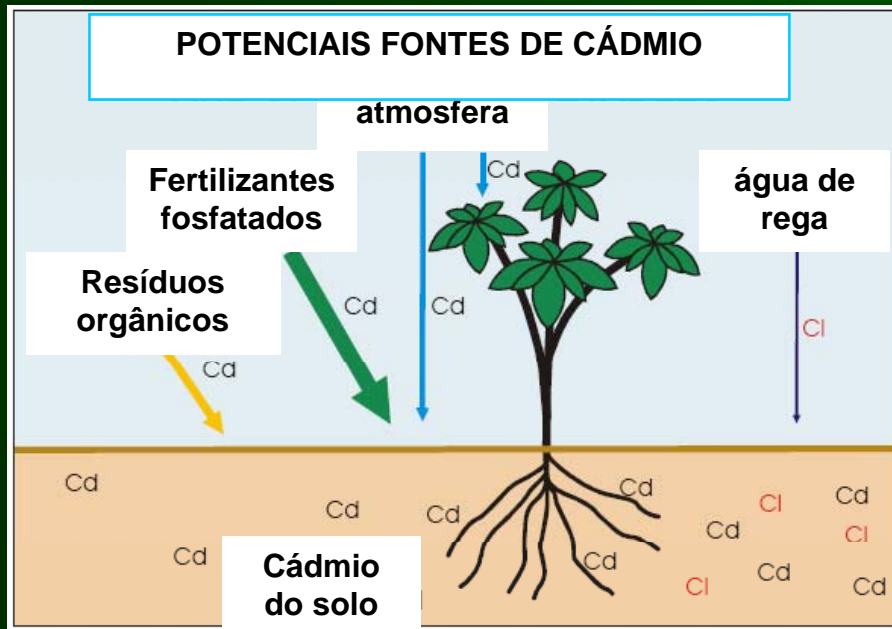
Mecanismos de genotoxicidade

1. Ligação directa do Cd a bases do DNA (G, A, T) (Hossain and Huq 2002; Valverde *et al.*, 2001)
2. Inibição da reparação do DNA (Jin *et al.*, 2003);
3. Produção de ROS.



Adaptado de Filipic *et al.*, 2006

Introdução



(adaptado de <http://www.cpcb.nic.in/News%20Letters/Latest/cadmium/ch8-CADMIUM.htm>)

Absorção pelas plantas

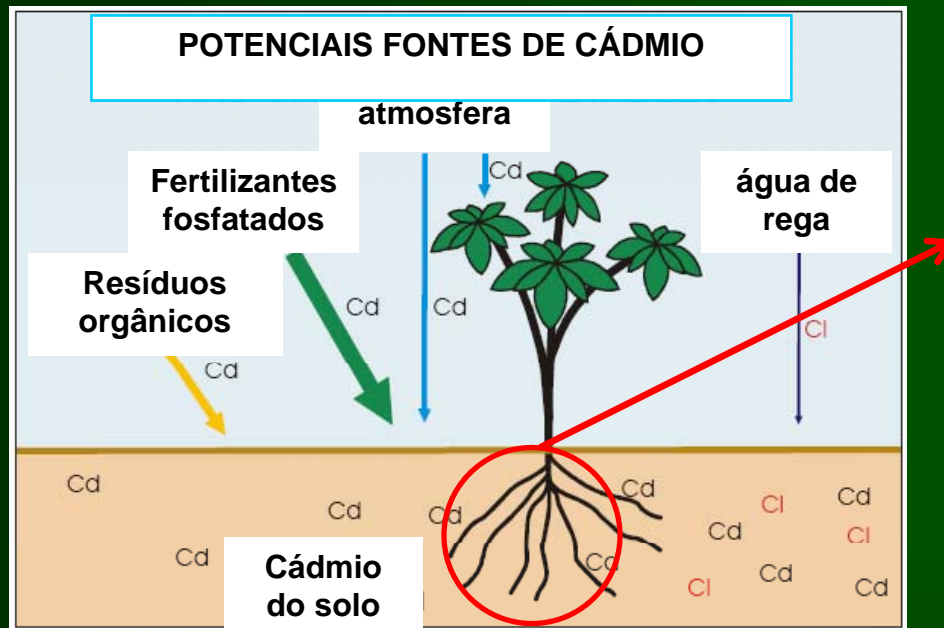
Características do solo (pH, conc. em outros iões, matéria orgânica);

Características da própria planta:

Excludora vs. Acumuladora;

Indicadoras

Introdução



(adaptado de <http://www.cpcb.nic.in/News%20Letters/Latest/cadmium/ch8-CADMIUM.htm>)

RAIZ

- Primeiro local de contacto;
- Mais sensível ao cádmio que parte aérea (e.g. Wójcik *et al.*, 2005);
- Estudos com resultados genotoxicidade apenas na raiz e não na parte aérea (e.g. Gichner *et al.*, 2008; Gichner *et al.*, 2004);

Thlaspi caerulescens
(hiperacumuladora de Cd)



Muito usada em estudos com vista a tornar a fitoextração uma actividade economicamente viável

Introdução

Microssatélites (SSR)

- Marcadores moleculares;
- Sequências curtas (1-6 pb), repetidas em *tandem* distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariótas;

-Vantagens:

- Comportamento co-dominante;
- Alto grau de polimorfismo;
- Primers desenvolvidos para uma espécie podem ser usados em espécies relacionadas.

SSR

- Mutagénese é indicativa de instabilidade genética e pode ser avaliada usando SSR;
- Avaliação de genotoxicidade em plantas (Monteiro *et al.*, 2007) ;
- Instabilidade de SSR como marcador para o cancro (Maehara *et al.*, 2001).

Objectivo principal:

Avaliar a instabilidade genética induzida por cádmio, em *T. arvense* e *T. caerulescens*, através da análise de microssatélites



Foto: Arne Anderberg
T. caerulescens (adaptado de www.petzi.org/thlaspi/tcae1.jpg)



T. arvense (adaptado de www.missouriplants.com/Whitealt/Thlaspi_arven...)

Objectivos:

Procurou-se ainda responder a outras questões:

1. A toxicidade do Cd manifesta-se morfologicamente (e.g. clorose das folhas).

A resposta de *T. arvense* e *T. caerulescens* é morfologicamente distinta?

2. O Cd afecta o crescimento das plantas. **O crescimento de *T. arvense* e *T. caerulescens* é afectado de forma diferente?**

3. Usualmente o conteúdo de Cd é maior na raiz mas tem expressão considerável nas folhas. Nas hiperacumuladoras a translocação do metal absorvido para a parte aérea tem importância significativa. **O padrão de partição do Cd acumulado nas duas espécies é similar?**

4. O Cd é genotóxico e mutagénico. A mutagénese é indicativa de instabilidade genética e pode ser avaliada por microssatélites. **Nas condições de estudo, há instabilidade genética, identificável por instabilidade de microssatélites (MSI) em *T. arvense*? E em *T. caerulescens*?**



Avaliar a instabilidade genética induzida por cádmio, em *T. arvense* e *T. caerulescens*, através da análise de microssatélites

Materiais e Métodos

Material biológico e condições de crescimento

Condições experimentais:

- Cultura hidropônica
- Cultura em câmara de crescimento
- Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$
- 16H luz:8H escuro
- Humidade constante

Mestrado em Toxicologia

Dia 0

Sementes de *T.arvense* e *T.caerulescens* (ecot. Ganges) foram colocadas a germinar em água destilada (0 e 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$)

Dia 6

Plântulas *T.arvense* e *T.caerulescens* foram mudadas para perlite onde cresceram em meio de Rorison (modificado) na presença de 0 e 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$

Medição (comp.) da raiz e parte aérea



Dia 28

Plantas foram colhidas

Medição de raiz e porção aérea (comp., peso)

Análise de SSR (raiz)

Análise de Cd (ICP-AES) (raiz e folha)

Materiais e Métodos

Análise de SSR (raíz)

Escolha dos microssatélites

General features of the 15 genomic DNA regions characterised for sequence polymorphism by Basic and Besnard (2006)

Gene code	Putative homologous gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> and encoded protein
Tc-ZNT1	At1g10970 – Zn and Cd transporter
Tc-ZNT2	At1g60960 – Putative Zn transporter
Tc-ZNT5	At1g05300 – Putative Zn transporter
Tc-E2F1	At5g22220 – E2F transcription factor-1
Tc-IRT1	At4g19690 – Putative Fe(II) transporter-1
Tc-IRT2	At4g19680 – Putative Fe(II) transporter-2
Tc-WRKY	At4g31550 – WRKY transcription factor
Tc-AGAMOUS	At4g18960 – Floral homeotic protein AGAMOUS
Tc-CP	At1g30630 – Putative coatomer protein
Tc-up1	At2g47440 – Unknown protein
Tc-up2 (Ap5) ^a	At3g01860 – Unknown protein
Tc-up3 (Ap6)	At1g16500 – Unknown protein
Tc-NOD (Ap7)	At4g30420 – Nodulin-like protein
Tc-up4 (Ap8)	At3g25410 – Unknown protein
Tc-bHLH (Na10-G10)	At5g04150 – bHLH transcription factor

Materiais e Métodos

Análise de SSR (raíz)

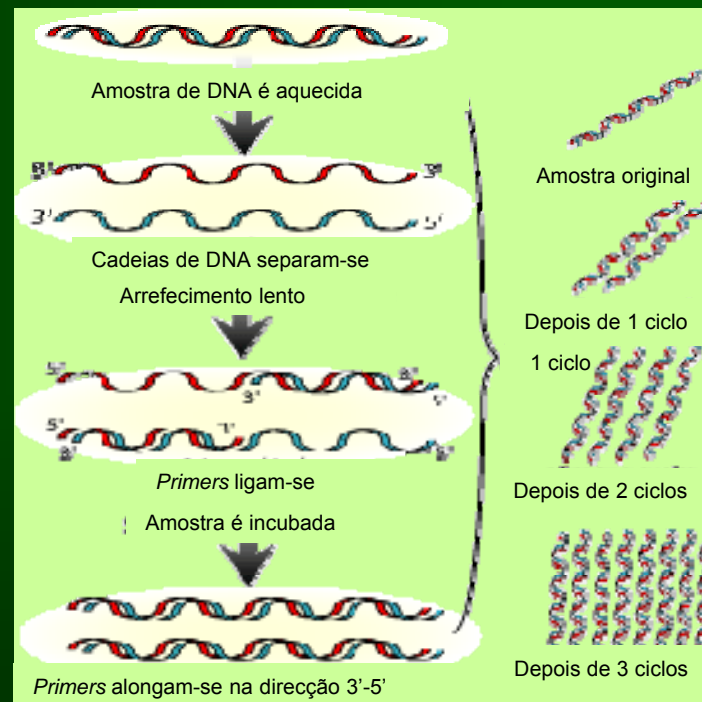


Extracção de
DNA genómico

PCR (reacção em
cadeia da polimerase)

Visualização
dos
fragmentos

(ABI Prism 310 Genetic
Analyser)



(adaptado de: www.scg.ubc.ca/wp-content/pcr1.GIF.gif)

Materiais e Métodos

Análise de SSR (raíz)



Extracção de
DNA genómico

PCR (reacção em
cadeia da polimerase)

Visualização
dos
fragmentos

(ABI Prism 310 Genetic
Analyser)

Características dos microssatélites

(Adaptado de Basic e Besnard, 2006)

GenBank accessions no.	Locus name / SSR	Primer (5' → 3')	T_a (°C)	MgCl ₂ (mM)
AF292029	Tc-ZNT5 Ssr (9,10)	<i>f.</i> AATCACACAAAACGTTAAGCTC <i>r. Hex</i> – AAGGTATGGCGGCGATCTTG	53	1.5
AJ746208	Tc-IRT1 Ssr (11,12)	<i>f.</i> CTTGCGATATCGAGTCATTGC <i>r. Fam</i> – TCCAATGACCACAGAGTGAAC	53	1.5
AJ746244	Tc-CP Ssr (15,16)	<i>f.</i> TTTGGAGTTAGACACGGATCTG <i>r. Hex</i> – GTTGATCGCAGCTTGATAAGC	53	1.5
AJ746215	Tc-NOD Ssr (17,18)	<i>f.</i> AAGTACGTGTACGCCAACCG <i>r. Fam</i> – TGTACTCCTCTAACTTCCCC	53	5.5
AJ746217	Tc-bHLH Ssr (19,20)	<i>f.</i> CTTGGAAACATTGGTGTTAAGG <i>r. Fam</i> – GATTCCATCTCAAATCCGGTC	53	1.5

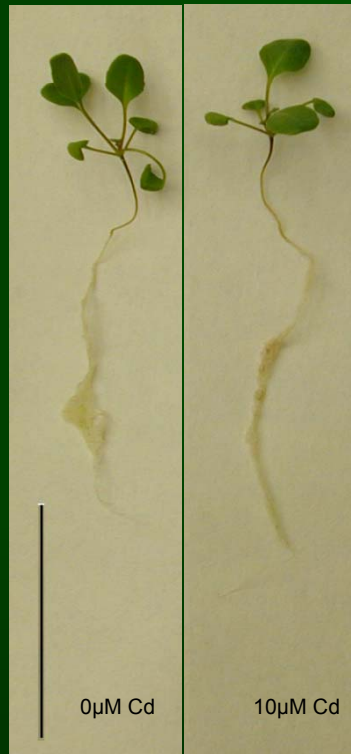
Resultados/Discussão

1. A resposta de *T. arvense* e *T. caerulescens* é morfologicamente distinta?

T. arvense



T. caerulescens



T. arvense

- Folhas expandidas necróticas;
- Clorose generalizada.

T. caerulescens

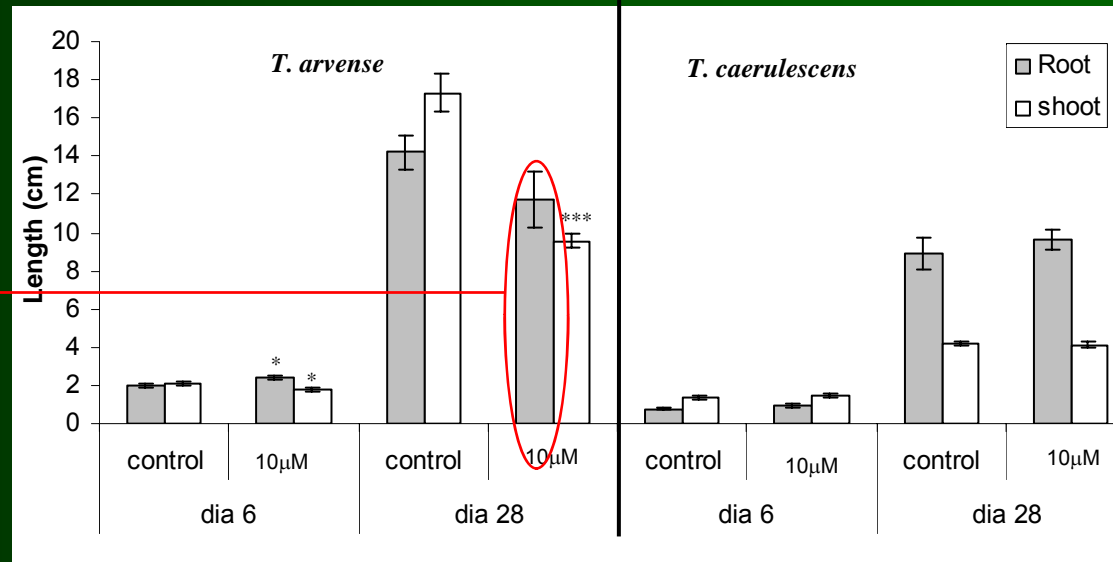
- Não se observam diferenças na morfologia das plantas expostas, face ao controlo

Resultados/Discussão

2. O crescimento de *T. arvense* e *T. caerulescens* é afectado de forma diferente?

Crescimento

Não há diferenças significativas, no limite ($p=0.072$)



T. arvense

- Há diferenças significativas:
- Raíz (dia 6)
- Parte aérea (dias 6 e 28);

T. caerulescens

Não há diferenças significativas

Resultados/Discussão

3. Há diferenças de acumulação de Cd e/ou localização do Cd acumulado?

Acumulação de Cádmio

T.a. vs T.c.

-Raiz de T.a. acumula ± 2.4 Xs mais que raiz de T.c.

-Parte aérea de T.c. acumula ± 4.4 Xs mais que parte aérea de T.a.

acumula ± 2.4 Xs e T.c. e T.c. acumula \pm e parte aérea de	Acumulação de Cádmio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Peso Seco)			
	<i>Thlaspi arvense</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
	Controlo	10 μM	Controlo	10 μM
Raiz	0.000 \pm 0.0000	0.536 \pm 0.0843	0.066 \pm 0.0155	0.222 ^a
Folhas	0.014 \pm 0.0111	0.174 \pm 0.0221 *	0.051 \pm 0.0175	0.762 \pm 0.0651 ***

T. arvense

- Não há diferenças significativas na raiz;
- Há diferenças significativas nas folhas de plantas expostas Cd face ao controlo;
- Raiz acumula ± 3 vezes mais que folhas.

T. caerulescens

- Folha apresenta diferenças significativas; (análise estatística da raiz não foi possível)
- Folha acumula ± 3.4 vezes mais que raiz.

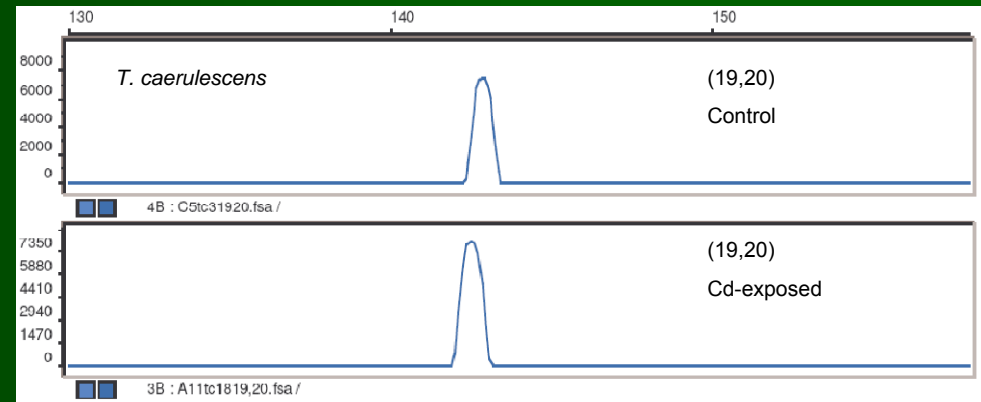
Resultados/Discussão

Instabilidade de microssatélites

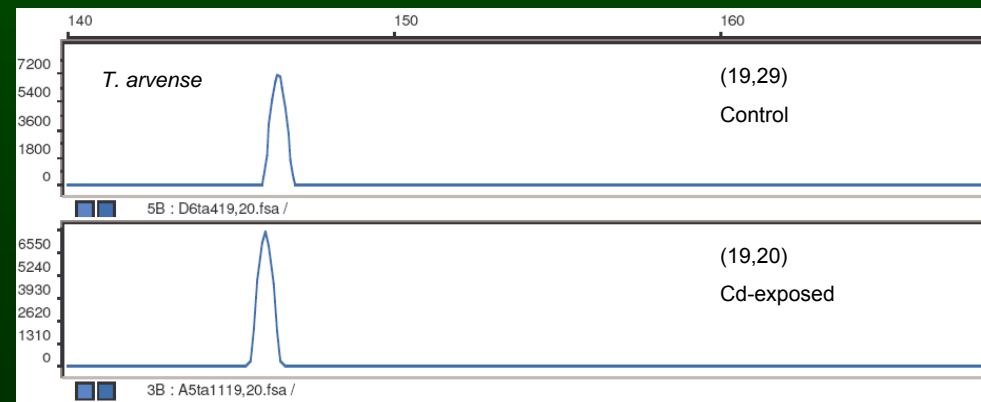
4. A resposta em termos de MSI é diferente para as duas espécies e para as condições de estudo?



Amplificação de SSRs bem sucedida



FAM dye (Blue color)



FAM dye (Blue color)

Resultados/Discussão

4. A resposta em termos de MSI é diferente para as duas espécies e para as condições de estudo?

Instabilidade de microssatélites

		Allele size (pb)			
		<i>T. arvense</i>		<i>T. caerulescens</i>	
		Control	Cd-exposed plants	Control	Cd-exposed plants
Locus name	SSR				
Tc-ZNT5	(9,10)	153/155	153/155	153/155	153/155
Tc-IRT1	(11,12)	142	142	170	170
Tc-CP	(15,16)	143	143	159/161	159/161
Tc-NOD	(17,18)	206/208	206/208	246	246
Tc-bHLH	(19,20)	146	146	143	143

Não foi detectada instabilidade genética

Resultados/Discussão

1. A resposta de *T. arvense* e *T. caerulescens* é morfologicamente distinta?



Apenas folhas expandidas de *T. arvense* necróticas ou com clorose evidente

2. O crescimento de *T. arvense* e *T. caerulescens* é afectado de forma diferente?



O crescimento de *T. arvense* é afectado

T. caerulescens não vê o seu crescimento afectado

3. Há diferenças de acumulação de Cd e/ou localização do Cd acumulado?



T. caerulescens apresenta diferenças de acumulação de Cd significativas na raiz

(Folha não foi possível avaliar estatisticamente)

4. A resposta em termos de MSI é diferente para as duas espécies e para as condições de estudo?



Não foi detectada instabilidade genética

Discussão

-Em concentrações **acima de 35µM** só hiperacumuladoras conseguem crescer (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999);

-Estudos anteriores demonstram haver **MSI em raiz de *Lactuca sativa*** exposta a **10µM Cd** (Monteiro *et al.*, 2007);

-A **translocação** de metais da raiz para a parte aérea parece ser **importante na hiperacumulação** (Pence *et al.*, 2000)

Podendo explicar;

- a maior acumulação de Cd na parte aérea de *T.caerulescens* em relação à raiz;
- a maior acumulação de Cd na raiz de *T.arvense* do que na raiz da hiperacumuladora

Discussão

A avaliação dos 5 microssatélites em estudo sugere **não haver instabilidade genética** para as condições de estudo

-Mobilização para compartimentos metabolicamente inativos;

-Activação de mecanismos com vista a manter a homeostase;

-Processo de reparação do DNA.

Perspectivas Futuras

A informação fornecida é restringida à sequência avaliada.



Utilizar uma **bateria** de técnicas moleculares (**RAPDs, AFLPs**);

Recorrer a técnicas como **Micronúcleos e Ensaio Cometa**

Estudo nomeadamente de **CAPS** descritos pelos mesmos autores

Cultura *in situ*, período de exposição: ciclo de vida (fisiologia, genotoxicidade, etc)

Comparação com outros **ecotipos** de *T. caerulescens* (e.g. **Prayon**)

Análise multi e interdisciplinar

Estudo em condições semelhantes e para as mesmas plantas (**Citometria de Fluxo**) não detectou alterações de ploidia (Monteiro *et al.*, 2007)



Análise multi/interdisciplinar

**Maior capacidade de intervenção
atempada nos ecossistemas**

**Maior conhecimento dos
genes/mecanismos responsáveis
pela acumulação**

(melhorar a qualidade dos solos;
recuperar solos poluídos;
melhorar a qualidade nutricional dos alimentos)

acqua.wordpress.com/.../22/dia-mundial-da-terra/

Referências Bibliográficas

- BENAVIDES, Maria P.; GALLEGGO, Susana M.; TOMARO, Maria L.. Cadmium toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol** 17 (1) (2005) 21-34.
- CLEMENS, S..Toxic metal accumulation, responses to expodure and mechanisms of tolerance in plants. **Science Direct – Biochimie** 88 (2006) 1707-1719.
- FILIPIC, M; FATUR, T; VUDRAG,M.. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. **Human & Experimental Toxicology**. 25 (2006) 67-77.
- GICHNER, Tomás; PATKOVA, Z.; SZAKOVA, J.; ZNIDAR, DEMMEROVÁ, K.. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutation or homologous recombination in tobacco leaves. **Mutation Research / Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis** vol 559, Issues 1-2 (11 April 2004) 49-57.
- GICHNER, T; PATKOVA, Z; SZAKOVA, J; ZNIDAR, I; MUKHERJEE, A.. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and gamma-rays. **Environmental and Experimental Botany** 62 (2) (Mar 2008) 113-119.
- JIN, Yong Hwan; CLARK, Alan B.; SLEBOS, Robbert J. C.; AL-REFAI, Hanan; TAYLOR, Jack A.; KUNKEL, THOMAS A.; RESNICK, Michael A. and GORDENIN, Dmitry A.. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. **Nature Genetics**. Volume 34, nº3 (July 2003);
- HOSSAIN, Z; HUQ, F. Studies on the interaction between cadmium ions and nucleobases and nucleotides. **J Inorg Biochem** 90 (2002) 97-105.
- MAEHARA, Yoshihiko; ODA, Shinya; SUGIMACHI, Keizo. The instability within:problems in current analyses of microsatellite instability (mini review). **Mutation Research**. 461 (2001) 246-263.
- MISHRA, S.; SRIVASTAVA S.; TRIPATHI R. D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAHOSE S. V.; PRASAD, M. N. V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant physiology and Biochemistry**. 44 (2006) 25-37.
- MONTEIRO, M.; SANTOS, C; MANN, R.M.; SOARES, A.M.V.M. and LOPES, T.. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. Using nuclear microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**. 60 (3) (2007) 421-427. b)
- MONTEIRO, M.; RODRIGUEZ, E.; LOUREIRO, J.; SOARES, A.M.V.M.; MANN, R.M.; SANTOS, C. and LOPES, T.. Assessment of ploidy stability by flow cytometry in plants chronic exposed to cadmium. **Setac**, Porto, Portugal (20-24 May 2007)
- PENCE, Nicole S.; EBBS, Stephen D. ; LETHAM, Deborah L. D.; LASAT, Mitch M.; GARVIN, David F.; EIDE, David; KOCHIAN, Leon V.. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn / Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **PNAS** vol 97, nº 9 (April 2000) 4956-4960.
- SANITÀ Di TOPPI, L. and GABRIELLI, R.. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**. 41 (1999) 105-130.
- VALVERDE, M; TREJO, C; ROJAS, E.. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? **Mutagenesis** 16 (2001) 265-270.
- WÓJCIK, Malgorzata; VANGRONSVELD, Jaco; TUKIENDORF, Anna. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*.I Growth parameters, metal accumulation and Phytochelatin synthesis in response to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**. 53 (2005) 151-161
- ZIENOLDDINY, Shanbeh; SVENDSRUD, Debbie, H.; RYBERG, David; MIKALSEN, Aase B.; HAUGEN, Aage. Nickel (II) induces microsatellite mutations in human lung cancer cell lines. **Mutation Research**. 452 (2000) 91-100.

Agradecimentos

Professora Conceição Santos
Tina Lopes, Marta Monteiro

Às colegas Tânia e Cristina
À Liliana
À equipa do laboratório
(nomeadamente ao Armando)
Professor Luís Souto
Helena Moreira
Sílvia

Dr^a Rosa Cerveira
Dr João Pires

Ao meu núcleo duro de
estabilidade emocional
(papás e “afins”)

A todos os que com um
pequeno gesto ou conselho
contribuíram para a
concretização deste trabalho